



Mariana Amoroso das Neves Romão

Licenciada em Bioquímica

Nanoimunoensaios para a Detecção de Antígenos da Malária em Amostras Clínicas

Dissertação apresentada para a obtenção do Grau de Mestre em Bioquímica pela Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Orientador: Prof. Doutor Ricardo Franco, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Co-Orientador: Doutora Inês Gomes, Instituto de Medicina Molecular da Universidade de Lisboa

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Carlos Salgueiro

Arguente: Doutor Miguel Prudêncio

Vogal: Prof. Doutor Ricardo Franco



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Setembro 2014

Mariana Amoroso das Neves Romão

Licenciada em Bioquímica

**Nanoimunoensaios para a Detecção de Antígenos da Malária
em Amostras Clínicas**

Dissertação apresentada para a obtenção do Grau de Mestre em Bioquímica pela Faculdade de
Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Orientador: Prof. Doutor Ricardo Franco, Faculdade de Ciências e Tecnologia
da Universidade Nova de Lisboa

Co-Orientador: Doutora Inês Gomes, Instituto de Medicina Molecular da
Universidade de Lisboa

Júri:

Presidente: Prof. Doutor Carlos Salgueiro

Arguente: Doutor Miguel Prudêncio

Vogal: Prof. Doutor Ricardo Franco

Setembro 2014

Nanoimunoensaios para a Detecção de Antígenos da Malária em Amostras Clínicas

Este *Copyright*© pertence a Mariana Amoroso das Neves Romão e à Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor

Página em Branco

AGRADECIMENTOS

Ao meu Pai, pela pessoa que é, pelo exemplo que quero seguir. Por todo o apoio demonstrado nesta etapa, e sempre. Por me teres ensinado e motivado a seguir um caminho. Por me estimulares a crescer científica e pessoalmente. Pelo amor incondicional que transmites diariamente. Obrigada por tudo o que aprendemos, vivemos e ultrapassámos, juntos!

À Raquel Saramago, minha companheira, meu dia-a-dia. Pela paciência, pelo carinho e pelo apoio constante, interminável e incansável. Pelos desabafos em dias menos bons, pelas inúmeras trocas de impressões e por preencheres a falha quando as coisas não correm tão bem. Obrigada por partilhares comigo todas as conquistas e por me suportares e ajudares quando os obstáculos aparecem.

Ao Professor Ricardo Franco, meu orientador, por me ter acolhido no seu laboratório, me ter integrado na sua equipa de investigação e me ter acompanhado ao longo de todas as semanas. Pela sua competência científica e orientação dadas ao longo do ano. Obrigada por me ter proporcionado um trabalho pelo qual me apaixonei.

À Doutora Inês Gomes, minha co-orientadora, minha amiga. Formamos uma excelente equipa. Obrigada pela forma como me acolheste, me apoiaste e te disponibilizaste ao longo de todo o trabalho. Obrigada pelas correcções e sugestões relevantes feitas durante a orientação. Obrigada pela confiança que depositaste nos resultados que fomos obtendo diariamente.

À Leonor Soares e ao Miguel Moreira, pelos óptimos momentos que me proporcionaram, dia após dia de trabalho. Devo, em parte, ao bom ambiente criado entre nós, a grande motivação que ia crescendo todas as semanas. À Ana Chocalheiro, pela boa companhia e partilha de ideias.

Aos meus irmãos, Guilherme, Catarina e Mateus. Com vocês sinto-me mais completa e mais feliz. Obrigada pela confiança e valor que depositam em mim. Obrigada por me fazerem sentir especial e querida por vocês. À Margot Cardoso, por todo o apoio demonstrado ao longo desta etapa e pelas sugestões que deu para tornar o meu trabalho melhor.

Aos meus amigos. Foi com eles que me fui moldando e me tornei quem sou hoje. Considero-me um reflexo de todos eles, em conjunto. Com o apoio dos amigos torna-se mais fácil confrontar as adversidades.

À Faculdade de Ciências e Tecnologia, pelas óptimas condições que oferece aos seus alunos, para que possam absorver o máximo conhecimento e experiência, e assim possam um dia ser grandes profissionais.

Página em Branco

RESUMO

Sendo a malária uma doença infecciosa que põe em risco uma elevada percentagem da população mundial, a presente dissertação apresenta o desenvolvimento de um teste de diagnóstico rápido (RDT) para a detecção da infecção. Para a detecção dos antígenos de *Plasmodium falciparum* (Pf), parasita da malária, foram estudadas nanopartículas de ouro (AuNPs) com dois diâmetros médios diferentes, 17nm e 48nm, funcionalizadas e conjugadas com anticorpos específicos, formando os bionanoconjugados. Este trabalho abrange dois focos de investigação, interligados, de forma a atingir-se o objectivo proposto:

- i) Caracterização físico-química das AuNPs e dos bionanoconjugados em solução, usando a espectroscopia de UV-Visível, variando a força iónica e o pH do meio. A compreensão do comportamento e estabilidade das partículas consoante o seu diâmetro e revestimento tem em vista o melhoramento do RDT, tanto em sensibilidade como em custo;
- ii) Desenvolvimento do RDT usando um método que envolve uma ligação competitiva entre o antígeno e o anticorpo específico imobilizado à superfície das AuNPs. Os antígenos correspondem a biomarcadores da presença de Pf: *Heat Shock Protein 70* (PfHsp70) e *Histidine Rich Protein II* (PfHRP II). Como superfícies para o desenvolvimento do RDT foram usados a nitrocelulose e o papel de filtro.

Quanto maior é o diâmetro das AuNPs, maior é a estabilidade apresentada em solução quando aumentada a força iónica. Quando é variado o valor de pH do meio, as partículas adoptam um comportamento dependente do seu revestimento, independente do diâmetro. Os bionanoconjugados formados com AuNPs de ambos os diâmetros revelaram-se muito estáveis em solução, numa gama de forças iónicas de 0 a 0,5M de cloreto de sódio, e de pH de 2 a 7.

Uma vez que a proteína Hsp70 é produzida constitutivamente em diversas células humanas, é necessário trabalhar com proteínas específicas da infecção, que nesta dissertação foi a PfHRP II. Foram efectuados testes no suporte de nitrocelulose que provaram o reconhecimento da PfHRP II pelos bionanoconjugados AuNPs-MUA-anti-PfHRP II. Estes ensaios necessitam ainda de algumas optimizações.

Ensaio de *Western-Blot* permitiram a identificação da presença da PfHRP II em culturas infectadas, bem como a confirmação da sua ligação ao anticorpo específico, anti-PfHRP II. Um novo método de revelação é introduzido nesta técnica, efectuado através do uso dos bionanoconjugados. Este método mostrou-se promissor na medida em que é rápido, específico e de baixo custo.

O principal contributo do trabalho consistiu no desenvolvimento, com sucesso, de um RDT para diagnóstico de malária, usando o antígeno PfHsp70, tendo como base a detecção colorimétrica com AuNPs de 17nm de diâmetro. Usando uma tira de nitrocelulose foi estabelecido um limite de detecção correspondente a 1600parasitas/ μ L, valor este considerado válido pela OMS para um correcto diagnóstico de malária. O limite de detecção obtido para as AuNPs de 48nm foi superior, não tendo trazido melhorias para o teste desenvolvido com AuNPs de menor diâmetro.

Palavras-Chave: Malária; Nanopartículas de Ouro; Anticorpo; Antígeno; Bionanoconjugados; RDT

Página em Branco

ABSTRACT

Being Malaria an infectious disease that endangers a high percentage of the world population, this thesis presents the development of a Rapid Diagnostic Test (RDT) for the detection of the infection. For detection of antigens from *Plasmodium falciparum* (Pf), malaria parasite, there were studied gold nanoparticles (AuNPs) with two different diameters, 17nm and 48nm, functionalized and conjugated with specific antibodies, forming the bionanoconjugates. This work includes two interconnected focus of research, in order to achieve the proposal goal:

- i) Physico-chemical characterization of AuNPs and bionanoconjugates in solution using UV-Visible spectroscopy, varying ionic strength and pH. Understanding the behavior and stability of the particles, depending on their diameter and coating, aims at improving both the RDT sensitivity as in cost;
- ii) Development of the RDT using a method that involves a competitive binding between the antigen and specific antibody immobilized on the AuNPs's surface. The antigens represent biomarkers of the presence of Pf: *Heat Shock Protein 70* (PfHsp70) and *Histidine Rich Protein II* (PfHRP II). As surfaces for the development of RDT there were used nitrocellulose and filter paper.

The larger the diameter of AuNPs, the greater stability appears in solution when the ionic strength increased. When the pH value of the medium is varied, the particles take a dependent behavior of the coating, independent of the diameter. The bionanoconjugates formed with AuNPs with both diameters proved to be very stable in solution, with ionic strengths in the range of 0 to 0.5M sodium chloride and pH 2 to 7.

Since the Hsp70 protein is produced constitutively in several human cells, it is necessary to work with specific infection proteins, which in this work was PfHRP II. Tests were carried out on nitrocellulose support that proved the recognition of PfHRP II by bionanoconjugates AuNPs-MUA-anti-PfHRP II. These tests still require some optimizations.

Western-blot assays allowed the identification of the presence of PfHRP II in infected cultures, as well as confirmation of their attachment to specific antibody, anti-PfHRP II. A new revealing method is introduced in this technique, performed through use of bionanoconjugates. This method was proven to be promising because is rapid, specific and inexpensive.

The main contribution of this work has been the development successful RDT for malaria diagnosis using PfHsp70 antigen, based on colorimetric detection of AuNPs having a diameter of 17nm. By using a nitrocellulose strip it has been possible to establish a limit of detection corresponding to 1600parasitas/ μ L, a value considered valid by WHO for a correct diagnosis of malaria. The limit of detection obtained for AuNPs of 48nm was higher and did not brought improvements to the developed test AuNPs with a smaller diameter.

Key Words: Malaria; Gold Nanoparticles; Antibody; Antigen; Bionanoconjugates; RDT

Página em Branco

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	v
RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
I. LISTA DE ABREVIATURAS	xiii
II. LISTA DE SÍMBOLOS	xv
III. LISTA DE FIGURAS.....	xvii
IV. LISTA DE TABELAS.....	xxi
CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO E OBJECTIVOS.....	1
CAPÍTULO II: ESTADO DA ARTE.....	3
2.1 MALÁRIA – DOENÇA E DIAGNÓSTICO.....	3
2.2. TESTES DE DIAGNÓSTICO DE MALÁRIA	6
2.2.1. MICROSCOPIA ÓPTICA.....	6
2.2.2. MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA.....	7
2.2.3. DETECÇÃO DE SEQUÊNCIAS ESPECÍFICAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS	8
2.2.4. TESTES IMUNOCROMATOGRAFÍCOS OU TESTES DE DIAGNÓSTICO RÁPIDO (RDTs).....	9
2.3. BIOMARCADORES DE MALÁRIA: <i>PfHsp70</i> e <i>PfHRPII</i>	11
2.3.1. <i>PfHsp70</i>	11
2.3.2. <i>PfHRPII</i>	12
2.4. ANTICORPOS MONOCLONAIS ESPECÍFICOS: ANTI- <i>PfHSP70</i> (2E6) e ANTI- <i>PfHRPII</i>	13
2.5. NANOTECNOLOGIA e NANOPARTÍCULAS DE OURO: PROPRIEDADES e APLICAÇÕES	14
2.5.1 BIONANOCONJUGADOS.....	18
2.5.2. RDTs BASEADOS NOS BIONANOCONJUGADOS.....	19
2.5.3. <i>WESTERN-BLOT</i> - APLICAÇÕES COM BIONANOCONJUGADOS	20
CAPÍTULO III: MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
3.1. PRODUÇÃO, EXPRESSÃO e PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE <i>Plasmodium falciparum</i>	23
3.1.1. <i>PfHsp70</i>	23
3.1.2. <i>PfHRPII</i>	24
3.2. PRODUÇÃO e PURIFICAÇÃO DE ANTICORPO MONOCLONAL.....	26
3.2.1. Anti- <i>PfHsp70</i> , 2E6.....	26
3.2.2. Anti- <i>PfHRPII</i>	28
3.3. SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO (AuNPs)	28
3.3.1. CARACTERIZAÇÃO DAS AuNPs.....	29

3.4.FUNCIONALIZAÇÃO DAS AuNPs COM O ÁCIDO MERCAPTOUNDECANÓICO (MUA)	29
3.5.FORMAÇÃO DOS BIONANOCONJUGADOS (AuNPs-MUA-anti- <i>Pf</i> Hsp70/ <i>Pf</i> HRPII).....	30
3.6.ESTABILIDADE DAS NANOPARTÍCULAS e DOS BIONANOCONJUGADOS:.....	30
3.6.1. COM VARIAÇÃO DA FORÇA IÓNICA	31
3.6.2. COM VARIAÇÃO DO pH DO MEIO	31
3.7.ENSAIOS IMUNOCROMATOGRÁFICOS EM TIRAS DE NITROCELULOSE e PAPEL DE FILTRO	31
3.8.TÉCNICAS GERAIS	32
3.8.1. ELECTROFORESE EM GEL DE POLICRILAMIDA - SDS-PAGE.....	32
3.8.2. MÉTODO DO ACIDO BICINCONÍNICO - BCA	32
3.9.ENSAIOS DE WESTERN-BLOT.....	33
CAPÍTULO IV: RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
4.1 PRODUÇÃO, EXPRESSÃO e PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE <i>Plasmodium falciparum</i>	35
4.1.1. PROTEÍNA <i>Pf</i> Hsp70.....	35
4.1.2. PROTEÍNA <i>Pf</i> HRPII	36
4.2.PRODUÇÃO e PURIFICAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS	37
4.3.SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO (AuNPs)	39
4.4.FUNCIONALIZAÇÃO COM MUA.....	42
4.5.FORMAÇÃO DE BIONANOCONJUGADOS	45
4.6.ESTABILIDADE DAS NANOPARTÍCULAS e DOS BIONANOCONJUGADOS.....	48
4.6.1. VARIAÇÃO DA FORÇA IÓNICA.....	48
4.6.2. VARIAÇÃO DO pH	51
4.7 ENSAIOS IMUNOCROMATOGRÁFICOS EM TIRAS DE NITROCELULOSE E PAPEL DE FILTRO USANDO <i>Pf</i> Hsp70	53
4.8.ENSAIOS IMUNOCROMATOGRÁFICOS EM TIRAS DE NITROCELULOSE USANDO <i>Pf</i> HRPII ...	62
4.9.ENSAIOS DE <i>WESTERN-BLOT</i> USANDO <i>Pf</i> HRPII	62
CAPÍTULO V: CONCLUSÃO	67
5.1.SÍNTESE DO TRABALHO e DOS RESULTADOS	67
5.2.TRABALHO FUTURO	69
CAPÍTULO VI: BIBLIOGRAFIA.....	71
ANEXOS	77

I. LISTA DE ABREVIATURAS

ACT – Artemisinin-based Combination Therapie; Terapia combinada

AO – Acridine Orange; Laranja Acridino

AuNPs – Nanopartículas de Ouro

BCA – Bicinchoninic Acid Assay; Ensaio do Ácido Bicinchonínico

BCP - BenzothioCarboxylPurine

BSA – Bovine Serum Albumine; Albumina de Soro Bovino

DNA – DeoxyriboNucleic Acid; Ácido Desoxirribonucleico

EDTA – Ethylenediamine tetraacetic acid; Ácido Etilenodiamino tetra-acético

HAuCl₄ – Chloroauric Acid; Ácido Tetracloroáurico

HCl - Hydrochloric acid; Ácido Clorídrico

HNO₃ – Nitric Acid ; Ácido Nítrico

HRPII – Histidine Rich Protein II

Hsp70 – Heat Shock Protein 70

IgG - Imunoglobulina G

IPTG - Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

LB – Luria-Bertani

MUA – Mercapto-11-undecanoic Acid; Ácido Mercapto-11-Undecanóico

NaCl – Sodium Chloride; Cloreto de sódio

NP - Nanopartícula

Ni-NTA – Níquel-Nitrilotriacetic Acid Agarose

OD – Optical Density; Densidade Óptica

O.N. – Over Night;

RNA – Ribonucleic Acid; Ácido Ribonucleico

PBS – Phosphate buffered saline; Tampão fosfato-salino

Pf – *Plasmodium falciparum*

QBC - Quantitative Buffy Coat

RDT – Rapid Diagnostic Test; Teste de Diagnóstico Rápido

SDS-PAGE – Sodium Dodecyl Sulfate – Poliacrilamide Gel Electrophoresis

TEM - Transmission Electron Microscopy

UV-Vis – UltraViolet – Visible Spectroscopy

WHO|OMS – World Health Organization; Organização Mundial de Saúde

Página em Branco

II. LISTA DE SÍMBOLOS

°C – Graus Centrígrados

cm – Centímetros

Da – Daltons

ε - Coeficiente de Extinção

g – Gramas

kDa – Kilodaltons

L – Litros

M – Molar

min – Minutos

mL – Mililitros

mM – Milimolar

nm – Nanometros

p/v – Peso/volume

rpm – Rotações por minutos

µg – Microgramas

µL – Microlitro

µM – Micromolar

V – Volts

v/v – Volume/volume

wt – weigth

Página em Branco

III. LISTA DE FIGURAS

Figura 1. 1- Representação esquemática da formação dos bionanoconjugados utilizados. As AuNPs são funcionalizadas com MUA, seguido da conjugação com anticorpo (Ab) e do bloqueio com a proteína BSA.	1
Figura 2. 1 - Mapa mundial da transmissão da malária no ano de 2013. A verde correspondem os países onde já não há transmissão de malária, a vermelho onde a malária é ainda endémica, a azul, os países em fase de eliminação da malária. Figura adaptada de ⁵	3
Figura 2. 2 – Representação esquemática do ciclo de vida do parasita da Malária, tanto na sua fase assexuada, nos humanos, como na fase sexuada, no mosquito. Figura adaptado de ⁸	4
Figura 2. 3 - Resultados dos testes obtidos por microscopia óptica. A - Filme espesso, mostrando elevada densidade de parasiténia ²⁰ e B - Filme fino, apresentando-se em ring à direita e esquizontes no centro da imagem ²¹	7
Figura 2. 4 - Trofozoítos de <i>Plasmodium falciparum</i> . A – Método de fluorescência utilizando o corante laranja de acridina (AO) e QBC; B – Método de fluorescência utilizando o corante benzotiocarboxilpurina ¹⁶	8
Figura 2. 5 - Estrutura tridimensional da proteína Heat Shock Protein70 de <i>Plasmodium falciparum</i> . À direita, o domínio N-terminal de ligação de nucleótidos (PDB:3HSC) ³⁸ que está ligado através de um <i>linker</i> flexível ao domínio de ligação do substrato (PDB:1DKZ) ³⁹	12
Figura 2. 6 - Estrutura tridimensional do modelo teórico da proteína Histidine Rich Protein II de <i>Plasmodium falciparum</i> (PDB:1L8M). A azul estão representadas as hélices α e a laranja as estruturas <i>random coils</i>	13
Figura 2. 7 – Representação esquemática de um anticorpo. Possui 2 cadeias pesadas e 2 cadeias leves, ligadas entre si por ligações dissulfídicas. Adaptado de ⁴³	14
Figura 2. 8 – Esquema representativo do efeito da Plasmónica de Ressonância Localizada de Superfície ⁵²	15
Figura 2. 9 - Agregação das AuNPs devido à adição de um sal. A solução de nanopartículas monodispersas apresenta uma cor vermelha, enquanto a solução de nanopartículas agregadas apresenta uma cor azul-arroxeadas ⁵⁶ . Nos espectros encontram-se curvas características de nanopartículas de ouro coloides e agregadas.....	17
Figura 2. 10 – Representação da molécula de MUA, ácido 11-mercaptopundecanóico.	17
Figura 2. 11 – Esquema do RDT elaborado em tiras de nitrocelulose. Na linha de teste encontra-se imobilizada a proteína alvo, e na linha de controlo o anti-IgG.....	20
Figura 2. 12 – Representação esquemática de detecção de um sinal através de um método indirecto no ensaio de <i>western-blot</i> , utilizando um anticorpo primário e um secundário que está complexado com uma enzima. Através da adição de um substrato, a enzima emite um sinal detectável. Adaptado de ⁶⁴	21
Figura 2. 13 - Representação esquemática do ensaio de <i>Western-Blot</i> utilizando bionanoconjugados. Adaptado de ⁶⁵	21
Figura 3. 1 – Representação esquemática do processo de produção e purificação da proteína PfHRP II desde o crescimento até à purificação.....	26
Figura 3. 2 - Mudanças de cor durante a síntese de nanopartículas de ouro. A solução inicial de ouro (III) (1) torna-se incolor após adição do citrato (2). Poucos segundos depois a solução fica	

preta/azul escura (3) e, finalmente, vermelha (4) indicando a formação de uma solução coloidal de nanopartículas de ouro.	28
Figura 3. 3 – Esquema da deposição das gotas na tira de nitrocelulose para a elaboração do RDT.	31
Figura 3. 4 - Esquema da deposição das gotas no papel de filtro com canais de cera impressos para elaboração do RDT.	32
Figura 3. 5 - <i>Western-Blot</i> em Sistema iBlot®. A - iBlot® Gel Transfer Device e; B - iBlot® Gel Transfer Stacks Nitrocelulose	33
 Figura 4. 1 – Gel SDS-PAGE (10%, 150V, 50min). MM – Marcador de Pesos Moleculares (kDa); 1 – Proteína <i>PfHsp70</i>	35
Figura 4. 2 - Gel SDS-PAGE (10%, 150V, 50min). MM – Marcador de Pesos Moleculares (kDa); 1 – Proteína <i>PfHRPII</i>	37
Figura 4. 3 - Gel SDS-PAGE (12%, 150V, 50min). MM – Marcador de Pesos Moleculares (kDa); 1 – Anticorpo anti- <i>PfHsp70</i> , 2E6	38
Figura 4. 4 - Gel SDS-PAGE (12%, 150V, 50min). MM – Marcador de Pesos Moleculares (kDa); 1 – Anticorpo anti- <i>PfHRPII</i>	38
Figura 4. 5 – Espectro UV-Vis da síntese de AuNPs com 17nm. Espectro com absorvância da LSPR máxima a 518nm com uma razão de agregação de 0,167. A concentração de AuNPs nesta solução é de 1nM.	39
Figura 4. 6 – Micrografia de TEM da solução coloidal de AuNPs 48nm.....	41
Figura 4. 7 - Espectro UV-Vis das AuNPs com 48nm. Espectro com absorvância da LSPR máxima a 532nm com uma razão de agregação de 0,26. A concentração de AuNPs nesta solução é de 0,05nM.	41
Figura 4. 8 – Espectro UV-Vis normalizado para a absorvância para comparação das intensidades das bandas LSPR das nanopartículas de ouro de 17nm e de 48nm.....	42
Figura 4. 9 – (A) Razão de Agregação das soluções de AuNPs 48nm com diferentes razões molares de MUA em função do valor de pH. A Razão de Agregação é calculada através do rácio entre a absorvância da forma agregada, aos 600nm, e a absorvância na forma não agregada, na banda de SPR, neste caso 532nm. Alteração de cor das soluções de AuNPs:MUA 1:30.000 (B) e 1:40.000 (C) com diferentes valores de pH.....	43
Figura 4. 10 – Espectro da solução de AuNPs-Citrato e de AuNPs-MUA para observar o desvio na LSPR quando é alterado o revestimento.....	44
Figura 4. 11 – (A) Razão de Agregação dos bionanoconjugados de AuNPs de 48nm preparados com diferentes razões molares de 2E6 (anti- <i>PfHsp70</i>) em função da concentração de NaCl. A razão de agregação é calculada através do rácio entre a absorvância da forma agregada, aos 600nm, e a absorvância da forma não agregada, na banda de LSPR, neste caso 532nm. (B) Alteração de cor das soluções de AuNPs:MUA:2E6 1:40.000:125 com diferentes concentrações de NaCl.	45
Figura 4. 12 – Espectros UV-Vis dos sobrenadantes obtidos a partir dos diferentes tempos de lavagem na formação dos bionanoconjugados. Os espectros (B) são ampliações dos espectros (A) correspondentes a cada lavagem.	47
Figura 4. 13 – Razão de Agregação das AuNPs de 17nm com AuNPs-citrato, AuNPs-MUA e Bionanoconjugados em função do aumento da concentração de NaCl no meio.....	49

Figura 4. 14 - Razão de Agregação das AuNPs de 48nm com AuNPs-citrato, AuNPs-MUA e Bionanoconjugados em função do aumento da concentração de NaCl no meio.....	50
Figura 4. 15 - Razão de Agregação das AuNPs de 17nm AuNPs-citrato, AuNPs-MUA e Bionanoconjugados em função do pH no meio.	51
Figura 4. 16 - Razão de Agregação observada para as AuNPs de 48nm AuNPs-citrato, AuNPs-MUA e Bionanoconjugados em função do pH no meio.	52
Figura 4. 17 – Incubação das tiras de nitrocelulose com a solução de bionanoconjugados.	54
Figura 4. 18 – Optimização da concentração de anti-IgG na zona de controlo, com gota de 5 µL numa gama de diluições de 2,5x a 100x. A zona de controlo contém uma gota de 20µL de proteína <i>PfHsp70</i> a 0,5mg/mL. As gotas tiveram diferentes tempos de secagem: (A) Durante a noite; (B) 4h; (C) 1h; (D) 30minutos. Incubação da tira de nitrocelulose com a solução 15nM de bionanoconjugados de 17nm durante 1h.	54
Figura 4. 19 – Optimização da concentração de anti-IgG na zona de controlo, com gota de 5µL numa gama de 2,5 a 100x diluído. O tempo de incubação das gotas foi apenas o necessário para a secagem. A zona de controlo contém uma gota de 5µL de <i>PfHsp70</i> a 0,5mg/mL. Incubação da tira de nitrocelulose com a solução 15nM de bionanoconjugados de 17nm durante 1h.	55
Figura 4. 20 – Optimização da concentração de <i>PfHsp70</i> na zona de teste. Testadas concentrações de antígeno entre 0,01 e 0,5mg/mL com gotas de 5µL. Incubação da tira de nitrocelulose com a solução 15nM de bionanoconjugados de 17nm durante 1h.....	55
Figura 4. 21 - Optimização do tempo de incubação da tira de nitrocelulose com a solução de bionanoconjugados de 17nm e 15nM. Demonstrada a zona de teste com gota de 5µL de <i>PfHsp70</i> a 0,25mg/mL.	56
Figura 4. 22 – RDT em tiras de nitrocelulose ilustrando um teste negativo (A) e um teste positivo (B), utilizando bionanoconjugados (AuNPs-MUA-anti- <i>PfHsp70</i>) de 17nm a 15nM.....	56
Figura 4. 23 – Representação da importância do uso da proteína BSA para bloquear a tira de nitrocelulose. A tira (A) foi bloqueada com BSA e a tira (B) não foi bloqueada.	57
Figura 4. 24 – Determinação do limite de detecção do RDT na nitrocelulose utilizando os bionanoconjugados (AuNPs-MUA-anti- <i>PfHsp70</i>) de 17nm.	58
Figura 4. 25 - RDT em tiras de nitrocelulose ilustrando um teste negativo (A) e um teste positivo (B), utilizando bionanoconjugados (AuNPs-MUA-anti- <i>PfHsp70</i>) de 48nm a 1,32nM.	58
Figura 4. 26 – Determinação do limite de detecção do RDT na nitrocelulose utilizando os bionanoconjugados (AuNPs-MUA-anti- <i>PfHsp70</i>) de 48nm.	59
Figura 4. 27 – Teste em diferentes superfícies para elaboração do RDT. (A) e (B) membrana nitrocelulose 0,45µm; (C) papel de filtro; e (D) <i>FUSION5</i> . A membrana (A) (C) (D) têm na zona de controlo anti-IgG diluído 25x e na zona de teste <i>PfHsp70</i> a 0,25mg/mL; a membrana (B) tem anti-IgG diluído 5x e <i>PfHsp70</i> a 1,8mg/mL. Usados bionanoconjugados (AuNPs-MUA-anti- <i>PfHsp70</i>) de 17nm a 15nM.....	60
Figura 4. 28 – RDT em papel de filtro com canais de cera impressos. Resultado de um teste negativo, utilizando bionanoconjugados (AuNPs-MUA-anti- <i>PfHsp70</i>) de 17nm a 15nM.	61
Figura 4. 29 – Determinação do limite de detecção em papel de filtro com canais de cera impressos usando os bionanoconjugados (AuNPs-MUA-anti- <i>PfHsp70</i>) 17nm.....	61
Figura 4. 30 - RDT em tiras de nitrocelulose ilustrando um teste negativo utilizando bionanoconjugados (AuNPs-MUA-anti- <i>PfHRPII</i>) de 17nm a 15nM. Na zona de teste foi usada uma gota de 5µL da proteína <i>PfHRPII</i> a 0,25mg/mL (A) e a 3,8mg/mL (B).....	62

Figura 4. 31 – Detecção da presença da proteína <i>PfHRP</i> II em cultura de eritrócitos infectados e não infectados. Revelação por quimioluminescência dos resultados de <i>Western-Blot</i> onde foi usado anti- <i>PfHRP</i> II. MM – Marcador de Pesos Moleculares; 1 – Proteína <i>PfHRP</i> II 2mg/mL; 2 – Cultura infectada com 1,7% parasitemia concentrada; 3 – Cultura infectada com 1,7% parasitemia diluída 5x; 4 – Cultura infectada com 0,7% parasitemia concentrada; 5 – Cultura infectada com 0,7% parasitemia diluída 5x; 6 – Cultura não infectada; 7 – Proteína <i>PfHRP</i> II 0,78mg/mL.	63
Figura 4. 32 - Detecção da presença da proteína <i>PfHRP</i> II em cultura de eritrócitos infectados e não infectados. Revelação dos resultados de <i>Western-Blot</i> através do uso dos bionanoconjugados (AuNPs-MUA-anti- <i>PfHRP</i> II). MM – Marcador de Pesos Moleculares; 1 – Proteína <i>PfHRP</i> II 2mg/mL; 2 – Cultura infectada com 1,7% parasitemia concentrada; 3 – Cultura infectada com 1,7% parasitemia diluída 5x; 4 – Cultura infectada com 0,7% parasitemia concentrada; 5 – Cultura infectada com 0,7% parasitemia diluída 5x; 6 – Cultura não infectada; 7 – Proteína <i>PfHRP</i> II 0,78mg/mL.	64
Figura A 1 – Representação do aparato usado para a técnica de SDS-PAGE. Adaptado de ⁸³	77
Figura A 2 – Reacção que ocorre no método BCA para determinação na concentração da proteína total em solução.	78
Figura A 3 - Recta de calibração pelo método de BCA para quantificação da proteína <i>PfHsp</i> 70 recombinante.	79
Figura A 4 - Recta de calibração pelo método de BCA para quantificação da proteína <i>PfHRP</i> II recombinante.	79
Figura A 5 - Recta de calibração pelo método de BCA para definição da quantidade de anticorpo e BSA que formam o Bionanoconjugado de 17nm.	80

IV. LISTA DE TABELAS

Tabela 2. 1 – Comparação das características dos RDTs com os filmes de sangue elaborados por microscopia ²⁸	9
Tabela 2. 2 - Resumo das principais características dos principais antígenos utilizados em RDTs para detecção da malária.....	10
 Tabela 4. 1 – Valores de densidade óptica e concentração obtidos para a amostra de proteína <i>PfHsp70</i>	36
Tabela 4. 2 - Valores de densidade óptica e concentração obtidos para a amostra de proteína <i>PfHRPII</i>	37
Tabela 4. 3 – Valores de concentração de NaCl nos quais foram atingidos os pontos de agregação para as AuNPs de 17nm com diferentes revestimentos.....	49
Tabela 4. 4 - Valores de concentração de NaCl nos quais foram atingidos os pontos de agregação para as AuNPs de 48nm com diferentes revestimentos.	50
Tabela 4. 5 - Valores de pH nos quais foram atingidos os pontos de agregação para as AuNPs de 17nm com diferentes revestimentos.	51
Tabela 4. 6 - Valores de pH nos quais foram atingidos os pontos de agregação para as AuNPs de 48nm com diferentes revestimentos.	52
 Tabela A 1 – Valores de concentração obtidos para as amostras dos sobrenadantes das 3 lavagens na formação dos bionanoconjugados.	80
Tabela A 2 – Cálculos para determinação da quantidade de MUA e anticorpo necessária para depositar à superfície das AuNPs de 17nm e 48nm.....	81

Página em Branco

CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO E OBJECTIVOS

A investigação na área da bionanotecnologia tem sido intensa e alvo de grande interesse por permitir aos cientistas criar, explorar e manipular nanomaterias. Estes podem evidenciar propriedades químicas, biológicas e físicas, que diferem dos seus homólogos à macro escala. A manipulação dos materiais está, por exemplo, a revolucionar a nanotecnologia médica, oferecendo novas oportunidades de diagnóstico rápido e financeiramente acessíveis para diversas doenças infecciosas, e no desenvolvimento de novos tratamentos.

A malária é uma doença infecciosa causada pelo parasita *Plasmodium* que põe em risco uma parte considerável da população mundial. Uma vez que neste momento ainda não se encontra disponível uma vacina, o diagnóstico precoce da doença permitirá uma actuação rápida contra a infecção do parasita, tentando desta forma controlar a sua proliferação. O método considerado ainda como “Gold Standard” é a microscopia óptica no entanto, para o executar, são necessários equipamentos e reagentes apropriados além de profissionais experientes. A maioria dos países onde a malária é endémica são países subdesenvolvidos, onde não é possível adquirir todas as ferramentas necessárias para um diagnóstico correto.

É neste âmbito que surgem os testes de diagnóstico rápido (RDTs, *Rapid Diagnostic Tests*) que pretendem ser rápidos, como o nome indica, sensíveis e de baixo custo, de forma a poderem intervir em todos os locais onde sejam necessários.

O principal objectivo da presente dissertação é o desenvolvimento de um imunoensaio muito sensível, baseado em nanopartículas de ouro (AuNPs). Estas por sua vez estão conjugadas com os anticorpos monoclonais específicos, anti-PfHsp70 (2E6) e anti-PfHRP II, para a detecção dos antígenos da malária PfHsp70 e PfHRP II, respectivamente.

Na concepção do ensaio, imuno-técnicas bem estabelecidas serão adaptadas ao uso das AuNPs. Um objectivo secundário será a exploração das propriedades à nanoescala, nomeadamente as ópticas e electrónicas, de forma aumentar a sensibilidade de detecção nos imunoensaios, diminuindo os seus custos.

Os antígenos a detectar, Hsp70 e HRP II de *Plasmodium falciparum* (Pf), serão purificados a partir de estirpes recombinantes de *E.coli* que os sobreexpressam. A estratégia utilizada para detecção inicia-se com o revestimento das AuNPs com MUA (ácido mercaptoundecanóico) e posterior conjugação com o anticorpo monoclonal (Ab) específico, anti-PfHsp70 ou anti-PfHRP II, respectivamente. De seguida, serão bloqueadas com a proteína albumina de soro de bovino (BSA), com vista a eliminar interacções inespecíficas, formando os bionanoconjugados (BNCs), tal como representado na Figura 1. 1.

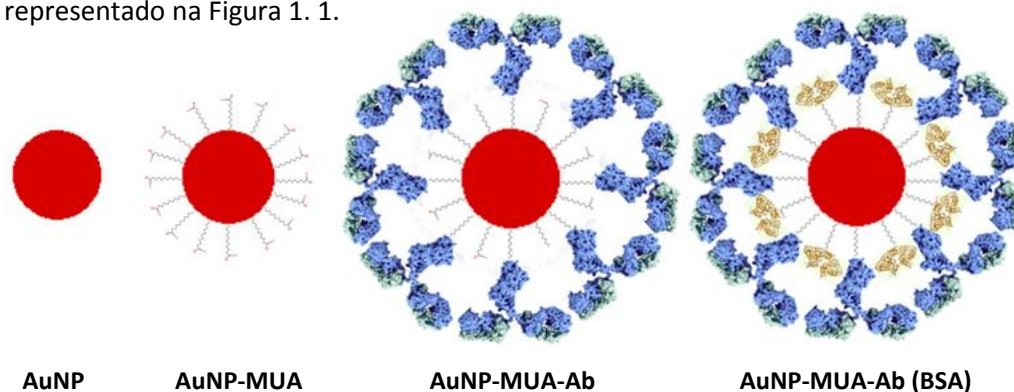


Figura 1. 1- Representação esquemática da formação dos bionanoconjugados utilizados. As AuNPs são funcionalizadas com MUA, seguido da conjugação com anticorpo (Ab) e do bloqueio com a proteína BSA.

Os bionanoconjugados serão usados nos ensaios imunocromatográficos que têm como superfície de migração uma membrana de nitrocelulose ou papel de filtro. As proteínas são detectadas pela reacção do bionanoconjugado AuNP-MUA-Ab com o respectivo antígeno, indicando infecção, através da presença da cor vermelha, proveniente das AuNPs.

Pretende-se que o ensaio assim desenvolvido seja utilizado para a detecção do antígeno em amostras de cultura de sangue infectado *in vitro* que contenham diferentes níveis de parasitemia e, acredita-se que, futuramente, em amostras clínicas reais.

CAPÍTULO II: ESTADO DA ARTE

2.1 MALÁRIA – DOENÇA E DIAGNÓSTICO

A malária é uma doença infecciosa causada por um parasita protozoário conhecido por *Plasmodium*. Os parasitas da malária são transmitidos aos seres humanos através da picada do mosquito fêmea *Anopheles* e é uma das infecções mais comuns em todo o mundo. A malária apenas é transmitida através da picada do mosquito ou através de transfusões sanguíneas, não sendo por isso sexualmente transmissível^{1,2}.

Em termos geográficos, a malária encontra-se maioritariamente situada em regiões centradas em torno do equador, nomeadamente numa grande parte da África Subsaariana, na Ásia e nas Américas central e do sul^{3,4}, como indicado na Figura 2. 1. Estas áreas de risco situam-se principalmente em regiões tropicais e/ou subtropicais, onde as condições ambientais (elevadas temperaturas e humidade) e existência de águas paradas² são adequadas para a proliferação do vector no mosquito *Anopheles spp.*.

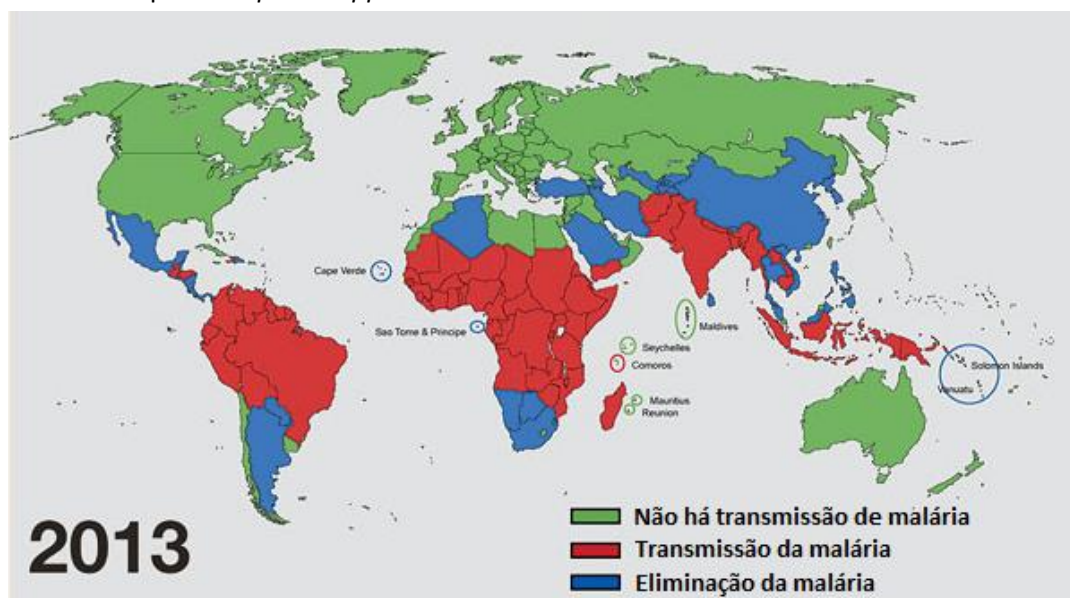


Figura 2. 1 - Mapa mundial da transmissão da malária no ano de 2013. A verde correspondem os países onde já não há transmissão de malária, a vermelho onde a malária é ainda endémica, a azul, os países em fase de eliminação da malária. Figura adaptada de ⁵

De acordo com os últimos dados da Organização Mundial de saúde (OMS, do inglês *World Health Organization*, WHO), entre os anos de 2000 e 2012 a taxa de mortalidade provocada pela malária reduziu globalmente entre cerca de 42% e 49% nas regiões africanas onde actua a OMS. Em crianças com idades inferiores a 5 anos, cuja faixa etária é a de maior incidência da doença, a taxa de mortalidade desceu 48% em todo o mundo⁴.

Ainda assim, no ano de 2013 a malária foi considerada endémica em mais de 104 países do mundo, onde em 97 deles a sua transmissão se encontra ainda activa⁴. Em 2012 registaram-se 207 milhões de casos ocorrentes de malária onde 627 mil resultaram em morte. Globalmente, estima-se que cerca de 3,4 mil milhões de pessoas estão em risco de contrair a doença⁴. De todos estes casos, 90% ocorrem em África e 77% incidem em crianças com menos de 5 anos de idade. Trata-se por isso de um problema grave tanto a nível social como económico, e com uma extrema

necessidade de ser controlado^{3,4}. Até 2015, o grande objectivo da OMS é diminuir as taxas de mortalidade em 52% globalmente e 60% em crianças até aos 5 anos⁴.

A ecologia natural que envolve os parasitas da malária infecta sucessivamente dois tipos de hospedeiros: os seres humanos e, como já acima mencionado, o mosquito fêmea da espécie *Anopheles*. A malária em humanos pode ser provocada por 5 espécies do parasita *Plasmodium* (*P.*), a *falciparum*, a *vivax*, a *ovale*, a *malariae* e a *knowleri*, sendo as duas primeiras as mais comuns^{4,6}. Por um lado, a *P. falciparum* é a causa de maior taxa de mortalidade, predominantemente em África, e por outro, a *P. vivax* é a menos perigosa mas a mais disseminada pelo mundo⁶. As restantes espécies são encontradas com menor frequência⁴.

O ciclo de vida do parasita *Plasmodium spp.* é bastante complexo e pode ser dividido em duas etapas de reprodução: uma etapa assexuada, que ocorre nos mamíferos (que incluem os humanos) e uma sexuada, que ocorre nos mosquitos fêmea⁷, como se pode observar na Figura 2.

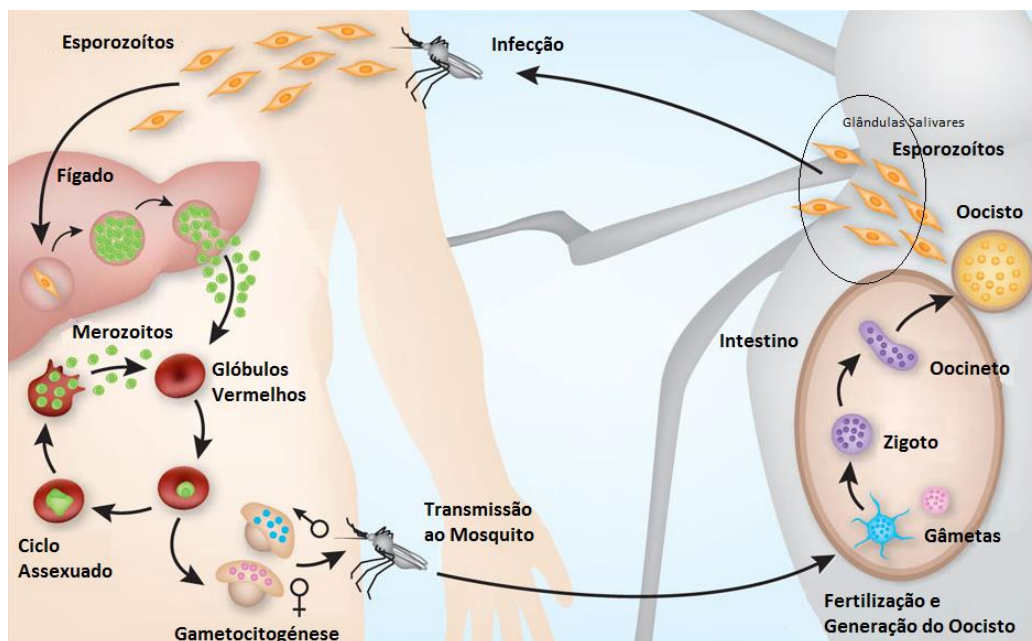


Figura 2. 2 – Representação esquemática do ciclo de vida do parasita da Malária, tanto na sua fase assexuada, nos humanos, como na fase sexuada, no mosquito. Figura adaptado de ⁸

Nos seres humanos o ciclo de vida tem início com a picada de um mosquito infectado. Os parasitas saem das glândulas salivares sob a forma de esporozoítos e entram na corrente sanguínea. Estes seguem em direcção às células do fígado, os hepatócitos, onde se vão reproduzir assexuadamente resultando na formação de centenas de merozoítos. A ruptura das células hepáticas leva à libertação dos merozoítos no sangue. Uma vez na corrente sanguínea, os merozoítos alcançam e invadem os glóbulos vermelhos e iniciam rapidamente o processo de multiplicação assexuada. Já dentro dos eritrócitos, os merozoítos amadurecem para trofozoítos e esquizontes até à ruptura da célula, libertando para o sangue uma nova geração de merozoítos que estão preparados para invadir outros glóbulos vermelhos. Ao mesmo tempo que uns merozoítos invadem diferentes células, outros evoluem para gâmetas imaturos, ou gametócitos. Neste estágio, os sintomas da malária começam a ser desencadeados^{1,7,8}.

Quando um mosquito fêmea pica um hospedeiro já infectado, os gametócitos são imediatamente absorvidos e amadurecem no intestino do mosquito. Os gametócitos femininos e

masculinos fertilizam e formam os zigotos, que se vão diferenciar originando oocistos. Estes, por sua vez, desenvolvem-se em esporozoítos uma vez que rebentam o oocisto, e migram para as glândulas salivares do mosquito, ficando prontos para serem injectados na corrente sanguínea do próximo hospedeiro humano^{1,8,9}.

A malária é uma doença fatal mas tratável sendo por isso de extrema importância a sua identificação precoce e correcta, o que nem sempre acontece. Os primeiros sintomas da malária são comuns às diferentes espécies do parasita: inicialmente são inespecíficos e assemelham-se aos de uma gripe, sendo por vezes de difícil diagnóstico¹⁰. Febres elevadas, calafrios, suores, diaforese, dores de cabeça e musculares e, por vezes, sintomas gastrointestinais como náuseas, vómitos e diarreia, são os primeiros sintomas de infecção. Em estados mais avançados, a malária pode levar a convulsões, comas, anormalidades psicológicas e também a anemias e insuficiências renais e respiratórias. Casos específicos de malária reportam números reduzidos de plaquetas, bilirrubina no sangue superior ao normal e aumento de volume do baço¹¹. Os sintomas da malária não aparecem de imediato, mas sim após um período denominado por incubação, que corresponde ao tempo entre a picada e o aparecimento dos primeiros sintomas, que pode durar entre 7 a 30 dias^{2,12}.

Actualmente existem dois tipos de problemas ao lidar com a infecção da malária: nos países onde os casos de malária são raros, os sintomas podem ser associados a gripes ou outras infecções comuns, afastando, erradamente, as hipóteses de se tratar de malária; nos países onde a malária é comum, muitas vezes os seus sintomas obrigam a fazer diagnósticos precipitados, sendo administrados químicos para a sua prevenção e tratamento. Esta administração indiscriminada de fármacos anti-maláricos, como a cloroquina e sulfadoxina-pirimetamina (SP), levou a que o parasita desenvolvesse resistências aos mesmos, tornando-se actualmente o maior obstáculo no combate à doença^{2,3,13}.

A malária é uma doença controlável, desde que sejam aplicadas as intervenções recomendadas³, tais como: (I) intervenções em grande escala no controlo do vector, nomeadamente com o uso de redes mosquiteiras tratados com insecticida e *sprays* insecticidas residuais; (II) quimioprevenção para as populações mais vulneráveis, particularmente mulheres grávidas e recém-nascidos; (III) confirmação do diagnóstico de malária através da microscopia óptica ou por RDTs para cada caso de suspeita de infecção; e (IV) tratamento atempado com medicamentos anti-maláricos apropriados, sendo actualmente as terapias combinadas à base de artemisinina (ACTs, *Artemisinin-based Combination Therapies*) o método mais eficaz^{3,14}, até agora, para *Plasmodium falciparum*. Com estas intervenções foi possível reduzir grandemente as taxas de mortalidade por malária.

Diagnósticos precoces e tratamentos da malária feitos atempadamente reduzem o número de pessoas infectadas, bem como o número de mortes, e, acima de tudo, diminuem a taxa de transmissão da doença. Desta forma pretende-se detectar a malária em estados clínicos iniciais e controlar o seu grave impacto na saúde pública.

Actualmente, o método mais comum para a elaboração de um diagnóstico de malária é ainda através de microscopias de óptica¹⁵. No entanto, além de exigir técnicos profissionalizados, exige equipamentos e técnicas específicas e onerosas, que muitas vezes não estão disponíveis. A amplificação genética, através do PCR (*Polymerase Chain Reaction*), é também uma forma de detectar o parasita. No entanto, esta é uma técnica que exige alguma complexidade e custo

elevado. Além disso, dispor dos reagentes e equipamentos necessários limita a sua disponibilidade e acessibilidade nas áreas onde a malária é endémica, que são, em grande parte, em países em vias de desenvolvimento^{13,15,16}.

Para contornar estes problemas, surgem os testes imunocromatográficos ou testes de diagnóstico rápido (RDTs). Estes pretendem fazer um diagnóstico rápido, sensível e específico. São também fáceis de manusear, geram resultados fáceis de interpretar e, acima de tudo, apresentam-se com um preço relativamente acessível para o seu uso¹⁶. Se estes dispositivos igualarem ou superarem a confiabilidade e a eficácia dos diagnósticos elaborados por microscopia óptica, que são os considerados “*gold standard*”, podem vir a ter um papel muito importante na prática clínica¹⁶.

Baseados em proteínas (antígenos e anticorpos), os RDTs têm um papel importante na periferia da capacidade dos serviços de saúde, porque é raro as clínicas rurais nos países endémicos terem a capacidade de diagnosticar a malária no local, devido à falta de material especializado e técnicos treinados para avaliar a infecção por microscopia ou PCR¹⁷.

2.2. TESTES DE DIAGNÓSTICO DE MALÁRIA

Existem duas formas de detectar os parasitas da malária em amostras de sangue. Uma recorre a métodos directos, que incluem a microscopia óptica e de fluorescência, a detecção de sequências específicas de ácidos nucleicos e ainda os testes imunocromatográficos, ou RDTs, a abordar de seguida. A outra recorre a métodos indirectos, dos quais fazem parte a citometria de fluxo e a espectroscopia de massa, que não foram estudados no presente trabalho.

2.2.1. MICROSCOPIA ÓPTICA

A microscopia óptica tem sido considerada o teste de eleição para o diagnóstico da malária e consiste na análise de filmes de sangue¹⁶. Existem dois tipos de filmes de sangue: espessos e finos. Os filmes espessos concentram várias camadas de eritrócitos, onde é possível contar o número de parasitas presentes. São mais sensíveis que os filmes finos e, como tal, mais aconselháveis para a detecção de baixos níveis de parasitemia, tão baixos como 5 parasitas/ μ L de sangue. Quanto mais concentrados estiverem os parasitas, maior é a taxa de lise dos glóbulos vermelhos, isto é, maior é o grau da infecção¹⁶. Ao contrário dos espessos, a vantagem dos filmes finos é permitir a identificação da espécie presente no sangue pois, com a devida preparação, a aparência do parasita está mais bem preservada. No entanto, é um teste menos sensível¹⁸. É importante que estas duas formas de análises sejam feitas em conjunto de forma a fazer um diagnóstico mais correcto e definitivo¹⁹. Na Figura 2. 3 podemos observar o tipo de resultados que se pode obter através da microscopia óptica, diferenciado entre o filme espesso e o fino.

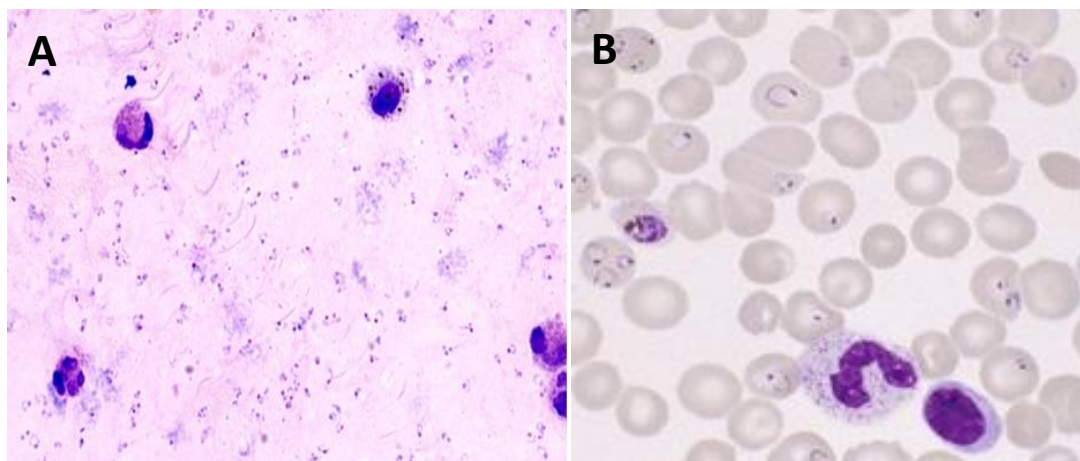


Figura 2. 3 - Resultados dos testes obtidos por microscopia óptica. A - Filme espesso, mostrando elevada densidade de parasitêmia²⁰ e B - Filme fino, apresentando-se em ring à direita e esquizontes no centro da imagem²¹

Com o auxílio do microscópio óptico, é importante avaliar a morfologia dos parasitas de forma a fazer uma interpretação precisa, notando particularmente a etapa de desenvolvimento e a presença de pigmentos de hemozoína que contém parasitas em ciclo assexuado¹⁶.

A grande vantagem da microscopia óptica deve-se ao facto de usar técnicas pré-estabelecidas, relativamente simples e comuns na maior parte dos laboratórios. Qualquer laboratório autorizado a executar um teste hematológico de rotina está equipado para fazer um filme espesso e/ou fino para a detecção do parasita da malária.

2.2.2. MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

A microscopia de fluorescência é um método microscópico alternativo aos filmes de sangue. Tem como base teórica a afinidade que certos corantes fluorescentes têm para os ácidos nucleicos presentes no núcleo do parasita, ligando-se aos mesmos. Quando estes corantes são excitados com luz UV-Visível, a um comprimento de onda específico, o mesmo núcleo irá fluorescer fortemente, sendo possível quantificar o número de parasitas/ μ L de sangue¹⁶.

Os corantes mais comuns para esta técnica são o laranja de acridina (AO, *Acridine Orange*) e o benzotiocarboxilpurina (BCP, *Benzothiocarboxylpurine*) que são ambos excitáveis a 490nm e apresentam uma fluorescência na gama do verde e do amarelo, respectivamente¹⁶. A técnica que utiliza o AO pode ser utilizada directamente, ou pode ser combinada com um método de concentração, como por exemplo os filmes de sangue espessos²². Um outro ensaio comum é o QBC (*Quantitative Buffy Coat*) que combina o uso do AO com a centrifugação, e que visa separar as camadas de leucócitos e de plaquetas. Os parasitas concentram-se por baixo dessas camadas de células, aparecendo na primeira camada de eritrócitos e podem ser visualizados através de um tubo capilar que está revestido com o corante, com o auxílio de um microscópio de fluorescência. Na Figura 2. 4 apresentam-se os resultados obtidos pelo método QBC com uso de AO e também o uso apenas do corante BCP¹⁶.

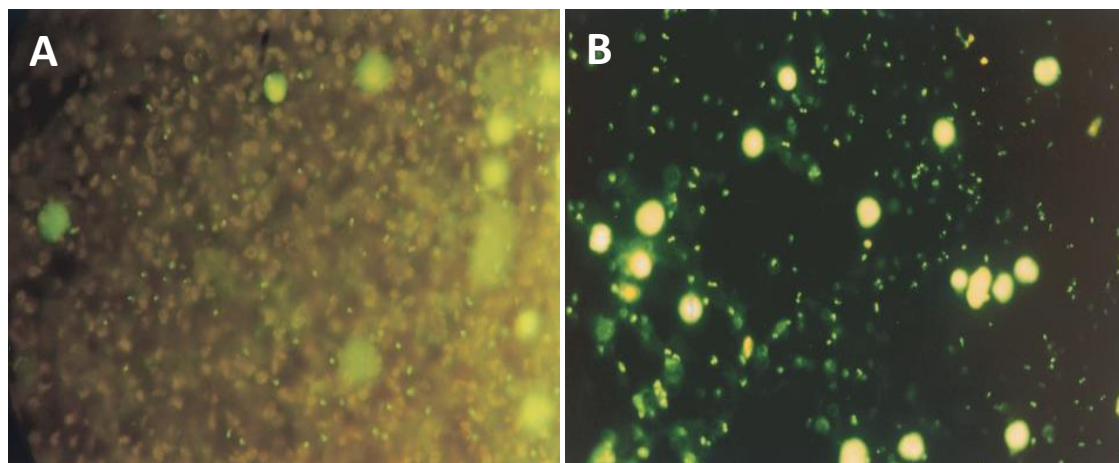


Figura 2. 4 - Trofozoítos de *Plasmodium falciparum*. A – Método de fluorescência utilizando o corante laranja de acridina (AO) e QBC; B – Método de fluorescência utilizando o corante benzotriocarbonyl purina¹⁶.

Apesar destes dois corantes serem bastante intensos, são inespecíficos e ligam-se aos ácidos nucleicos de todo o tipo de células. Consequentemente, quando são usados, é necessário aprender a distinguir as células dos parasitas que contêm a fluorescência, das outras células que contêm ácidos nucleicos de detritos²³. Apresentam como principal limitação o facto de não se conseguir diferenciar com facilidade as diferentes espécies de *Plasmodium*.

2.2.3. DETECÇÃO DE SEQUÊNCIAS ESPECÍFICAS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Diversas tecnologias de amplificação de ácidos nucleicos (NAATs, *Nucleic Acid Amplification Technologies*) existem para detectar o DNA do parasita em circulação na corrente sanguínea. São mais sensíveis que a microscopia e têm a capacidade para detectar 5 parasitas/ μ L ou níveis de parasitemia inferiores¹⁶.

Através dos NAATs é possível obter informações importantes quando surgem problemas morfológicos durante a tentativa de identificação das diferentes espécies do parasita¹⁶. A grande vantagem deste método é a sua capacidade para detectar o parasita da malária em pacientes com baixos níveis de parasitemia com 100% de sensibilidade e especificidade²⁴.

A tecnologia NAAT mais comum designa-se por PCR (*Polimerase Chain Reaction*). O PCR não se encontra disponível na maior parte das áreas endémicas de malária pois são necessários reagentes e equipamentos muito dispendiosos além de profissionais especializados. A interpretação dos resultados pode tornar-se desafiante devido ao facto de o DNA do parasita poder permanecer na corrente sanguínea algum tempo após a infecção estar debelada. Além disto, diferenciar uma infecção activa de uma infecção curada é difícil, uma vez que os níveis de parasitemia também não são necessariamente correlativos com a progressão da doença^{16,25}.

Os resultados que se obtém do PCR não estão muitas vezes disponíveis de forma suficientemente rápida, sendo esta a sua principal desvantagem no diagnóstico da infecção da malária².

2.2.4. TESTES IMUNOCROMATOGRÁFICOS OU TESTES DE DIAGNÓSTICO RÁPIDO (RDTs)

O desenvolvimento de testes imunocromatográficos, ou testes de diagnóstico rápido, têm sido alvo de intensa investigação especialmente devido às propriedades conferidas aos testes, como o fácil manuseamento e curto tempo de análise²⁶.

Algumas recomendações foram apresentadas pela OMS em relação às características que os RDTs deveriam obedecer: os resultados obtidos devem ser tão precisos quanto os obtidos por microscopia e além disso, deve ter uma sensibilidade acima dos 95%¹⁶ e ter um limite de detecção com um mínimo de 2000 parasitas/ μL ¹⁵. Outro critério que deve ser cumprido é ter a capacidade de distinguir parasitas viáveis de produtos de parasitas, como por exemplo antígenos ou ácidos nucleicos, que não estão associados aos parasitas viáveis¹⁶. Pretende-se que os RDTs apresentem resultados em 15-20 minutos, sejam vendidos em *kits* que contêm todos os reagentes necessários e que não seja necessário equipamento especializado para executar o ensaio nem para interpretar os resultados do mesmo^{17,27}.

Actualmente os RDTs ainda são considerados como complementos da microscopia convencional. Todavia, com algumas melhorias, pode vir a substituir o microscópio. Os testes são simples e o procedimento pode ser realizado no local, em condições de campo, sem ser necessário um laboratório, electricidade ou quaisquer equipamentos^{17,28}. Na Tabela 2. 1 são apresentadas as principais características do uso da microscopia óptica (filmes de sangue) em comparação com o uso dos RDTs.

Tabela 2. 1 – Comparação das características dos RDTs com os filmes de sangue elaborados por microscopia²⁸.

	Filmes de Sangue (Microscopia Óptica)	Testes de Diagnóstico Rápido, RDTs
Formato	Lamela com gota de sangue	Tira de teste
Equipamento	Microscópio	Apenas o <i>kit</i>
Instrução	Técnicos especializados	“Qualquer pessoa com pouco treino”
Duração do teste	20-60 minutos	5-30 minutos
Resultado do teste	Visualização directa dos parasitas	Mudança de cor nas linhas do teste
Capacidade	Detecta e diferencia todos os parasitas nos diferentes estágios	Detecta antígenos da malária (<i>PfHRPII</i> , <i>pLDH</i> e <i>Aldolase</i>) das formas assexuadas e/ou sexuada do parasita
Limite de detecção	5-10 parasitas/ μL de sangue	100-500 parasitas/ μL de sangue para <i>P. falciparum</i> e mais alta para <i>non-falciparum</i>
Quantificação	Possível	Não possível
Desvantagens	Disponibilidade do equipamento e microscopistas especializados, particularmente em zonas remotas	Eficiência imprevisível para níveis de parasitémia muito baixos ou muito elevados
Custo por teste	0,1 – 0,3 €	0,45 – 0,75 € ²⁹

Os RDTs para malária baseiam-se na captura dos principais antígenos específicos dos parasitas (proteínas) que circulam na corrente sanguínea, promovendo a sua ligação a um anticorpo específico que irá permitir a sua detecção¹⁴. Um dos testes mais comuns usa a HRPII como antígeno alvo, específica para *Plasmodium falciparum* que é a espécie mais perigosa, tornando-se por isso o teste mais disponível e menos caro¹⁶. Outro teste comum utiliza o antígeno lactose desidrogenase (LDH) *Plasmodium spp.*, que pode detectar todas as espécies de malária ou pode ser específico apenas para uma espécie¹⁶. A aldolase pode também ser utilizada para testes que detectam todas as espécies do parasita²⁸. Neste trabalho, para o desenvolvimento do RDT, foi utilizada a proteína *Heath Shock Protein70* de *Plasmodium falciparum*, *PfHsp70*, que é conhecida por ser detectável no sedimento de glóbulos vermelhos infectados com *P. falciparum*³⁰. Como o nome indica, é uma proteína induzível pelo calor, significando que é expressa em elevados níveis no parasita quando este é exposto a altas temperaturas (febres), conferindo-lhe protecção³¹. Foi também utilizada a proteína *Histidine Rich ProteinII* (HRPII) específica de *P. falciparum*. Na Tabela 2. 2 são apresentadas as principais características de cada uma das proteínas específicas da espécie *Plasmodium*.

Tabela 2. 2 - Resumo das principais características dos principais antígenos utilizados em RDTs para detecção da malária.

Antígeno	Principais Características durante a Infecção
<i>PfHRPII</i> ^{3,13,16,28}	<ul style="list-style-type: none"> ✖ Produzida apenas pelo <i>Plasmodium falciparum</i>; ✖ Presente na fase assexuada no citoplasma e membrana dos glóbulos vermelhos e em gametócitos imaturos; ✖ Expressa na superfície dos glóbulos vermelhos, iniciada após invasão dos glóbulos vermelhos por merozoítos e cessada após a sua ruptura; ✖ É solúvel em água e estável ao calor; ✖ Está envolvida na destoxificação do hemo do parasita; ✖ Persiste no sangue até no mínimo 28 dias após o início do tratamento.
LDH & Aldolase ^{3,13,16,28}	<ul style="list-style-type: none"> ✖ Produzidas por todas as espécies do parasita <i>Plasmodium</i>; ✖ Presente na fase eritrócita no citoplasma dos glóbulos vermelhos e em gametócitos maduros; ✖ LDH expressa-se na fase sexuada e assexuada do parasita no fígado. Está presente dentro dos eritrócitos infectados; ✖ Aldolase expressa-se na fase sanguínea da infecção, inicia a expressão após a invasão dos glóbulos vermelhos e cessa após a sua ruptura; ✖ É solúvel em água; ✖ É a principal enzima no ciclo da glicose do parasita; ✖ Desaparece do sangue rapidamente após tratamento.
<i>PfHsp70</i> ³²	<ul style="list-style-type: none"> ✖ Presente na fase exo-eritrócita (citoplasma e núcleo) e eritrócita (estruturas dentro dos glóbulos vermelhos infectados); ✖ Expressa-se durante a fase assexuada do ciclo; ✖ Pode também encontrar-se em circulação no sangue, uma vez que há relatos de anticorpos específicos; ✖ É solúvel em água; ✖ A sua função é praticamente desconhecida mas é sugerido que tenha um papel no controlo do ciclo celular, na tradução de proteínas e na imunogenicidade.

A mais recente tecnologia para o diagnóstico da malária incorpora procedimentos de captura imunocromatográficos, que utiliza anticorpos monoclonais que se irão ligar especificamente às proteínas, indicando infecção ou ausência dela. Os RDTs disponíveis correntemente podem adoptar diferentes formatos de teste, como tira (do inglês, *dipstick*), cassete ou cartão, todos eles fáceis de manusear²⁸. Além disso podem também utilizar diferentes tipos de superfícies para migração da amostra, tais como nitrocelulose, PVDF (*Polyvinilidene Difluoride*) ou papel de filtro. Neste trabalho foi desenvolvido um RDT no formato de tira usando uma membrana de nitrocelulose e usando também papel de filtro, onde este último foi utilizado com o intuito de facilitar a migração da amostra ao longo de uns canais de cera impressos.

2.3. BIOMARCADORES DE MALÁRIA: *PfHsp70* e *PfHRPII*

No presente trabalho vão ser usados dois diferentes antígenos: a *Heat Shock Protein70* (*PfHsp70*) e a Histidine Rich Protein (*PfHRPII*) de *P. falciparum*.

2.3.1. *PfHsp70*

As *Heat Shock Proteins* são uma família de proteínas altamente conservadas que ocorrem na maioria das formas de vida³³. São solúveis em água e têm como principal função a sua actividade enquanto chaperoninas moleculares, ligando-se a outras proteínas não nativas, facilitando o seu (*re*)*folding* até ao estado nativo. Geralmente têm o seu pico de expressão quando o organismo se encontra em situações de *stress*, nomeadamente quando está exposto a temperaturas elevadas. No entanto, em algumas espécies, algumas Hsp70 têm uma expressão constitutiva nas células^{32,33}.

A actividade que a Hsp70 pode ser capaz de desempenhar pode estar na base da propriedade que esta apresenta para interagir com segmentos peptídicos hidrofóbicos das proteínas, controlada por ATP (*Adenosine TriPhosphate*)³⁴.

Segundo alguns estudos, é cada vez mais evidente que as Hsp70 desempenham um papel importante na estratégia de sobrevivência do *Plasmodium falciparum* em condições de mudanças de temperatura, associados à passagem do sangue frio do mosquito para o sangue quente do humano^{31,32}. O interesse em compreender o possível papel da Hsp70 de *Plasmodium falciparum* (*PfHsp70*) levou à identificação de 6 tipos de genes de *PfHsp70*. A forma citosólica, *PfHsp70-1*, é aquela que é alvo de maior pesquisa pois pensa-se que desempenha um papel importante no ciclo de vida do parasita tanto como chaperonina quer como imunogénio^{32,35}. Esta proteína é expressa durante o ciclo de vida assexuado, que se desenvolve dentro dos humanos^{32,34}.

Análises recentes às vias de metabolização dos chaperoninas em *Plasmodium falciparum* sugerem que as Hsp70 têm um papel importante na adaptação do parasita ao seu hospedeiro. A sua síntese acelerada é a forma que o organismo adopta para combater em condições de *stress*³⁶. As Hsp70 estão localizadas no citosol da *Escherichia coli* e em todos os compartimentos das células eucariotas, como no cloroplasto, lúmen do retículo endoplasmático, matriz mitocondrial e citosol^{32,36}.

A proteína *PfHsp70* apresenta um peso molecular de aproximadamente 70kDa³². Estruturalmente possui 3 grandes domínios: o domínio de cerca de 45kDa *N*-terminal de ligação de nucleótidos (NBD, *Nucleotide-Binding Domain*), homólogo ao domínio ATPase da Hsp70 humana, que está ligado ao domínio de cerca de 15kDa de ligação do substrato (SBD, *Substrate-*

Binding Domain) onde se ligam os péptidos, através de uma região *linker* que está envolvida na regulação alostérica das actividades do NBD e SBD, e ainda um domínio C-terminal de ~10kDa^{33,37}. Na Figura 2. 5 pode ser observada a estrutura tridimensional da *PfHsp70*.

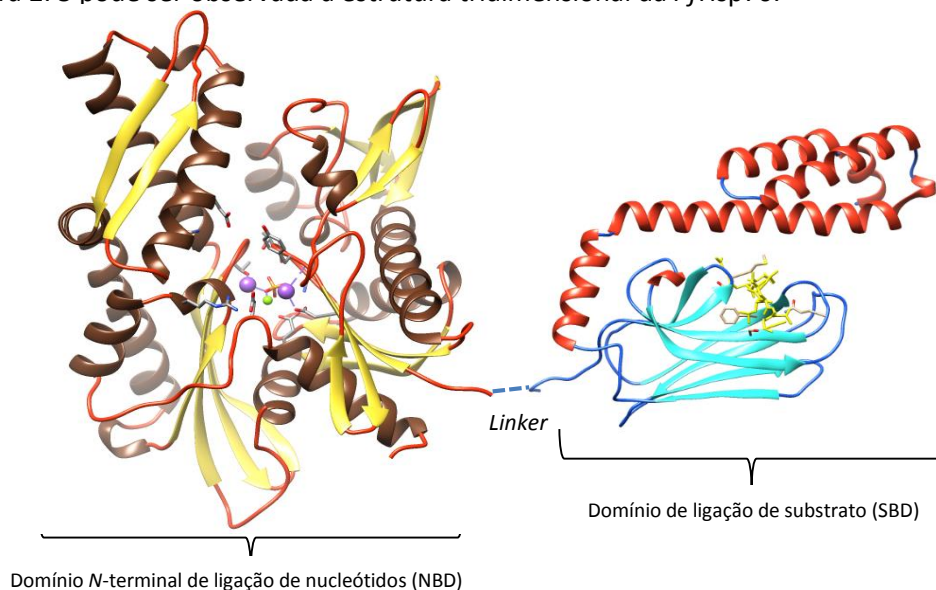


Figura 2. 5 - Estrutura tridimensional da proteína Heat Shock Protein70 de *Plasmodium falciparum*. À direita, o domínio N-terminal de ligação de nucleótidos (PDB:3HSC)³⁸ que está ligado através de um *linker* flexível ao domínio de ligação do substrato (PDB:1DKZ)³⁹

Esta representação da proteína *PfHsp70* foi gerada a partir do programa informático *Chimera 1.9*, através do código PDB 3HSC que se refere ao domínio da ligação de nucleótidos, ligado ao domínio de ligação do substrato, com o código PDB 1DKZ, através de um *linker*. O SBD representado tem um substrato ligado, a amarelo, que não faz parte da estrutura da proteína.

2.3.2. *PfHRPII*

A outra proteína que será utilizada neste trabalho é a *HRPII*. O elevado interesse e a intensiva utilização da *Histidine and Alanine Rich Protein* de *Plasmodium falciparum* (*PfHRP*) em testes RTDs advém da sua identificação em todos os parasitas da espécie *Plasmodium falciparum*, independentemente do seu fenótipo^{40,41}.

A *PfHRPII*, uma das proteínas dessa família, possui uma elevada percentagem de Histidinas (H) e Alaninas (A), como o nome indica, com 34% e 37%, respectivamente, e 10% da sua composição corresponde ao aminoácido ácido aspártico (D)⁴². São caracterizadas por conterem 51 vezes a repetição da sequência AHH⁴². É sintetizada pelo parasita e libertada a partir de eritrócitos infectados como uma proteína solúvel em água^{16,28}.

Está presente durante todo o ciclo de vida assexuado do parasita⁴⁰ e, no final do ciclo, quando se rompem os eritrócitos, a *PfHRPII* liberta-se para o plasma sanguíneo e pode atingir concentrações na gama dos micromolar (μM), tornando-se uma enorme vantagem na medida em que é de fácil detecção mesmo com um nível de parasitemia baixo (250 parasitas/ μL)⁴². Está situada em diversos compartimentos da célula incluindo no citoplasma do parasita⁴⁰.

A estrutura de um modelo teórico da *PfHRPII* apresenta-se na Figura 2. 6. A sua função ainda não está totalmente bem definida mas pensa-se que a *PfHRPII* pode actuar em diversas vias, por exemplo, assumir o papel de uma hemopolimerase que destoxifica os grupos hemo livres convertendo-os em hemozoína inactiva na remodelação do citoesqueleto dos eritrócitos infectados; na modulação de respostas imunitárias e ainda na ligação a iões de zinco. (Zn^{2+})^{40,42}.

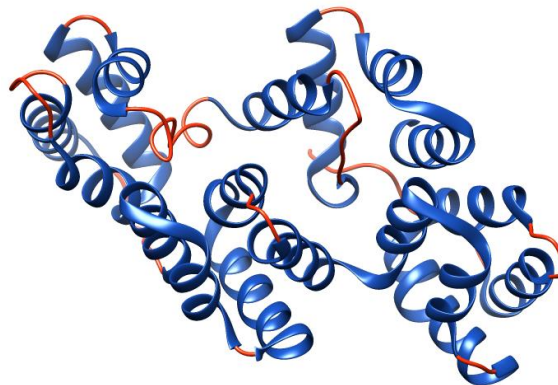


Figura 2. 6 - Estrutura tridimensional do modelo teórico da proteína Histidine Rich Protein II de *Plasmodium falciparum* (PDB:1L8M). A azul estão representadas as hélices α e a laranja as estruturas *random coils*.

Uma desvantagem do uso da *PfHRPII* decorre da sua persistência na corrente sanguínea no mínimo 28 dias após o início do tratamento²⁸, levando potencialmente a falsos positivos. Outro problema associado é o facto de ser uma proteína polimórfica, isto é, conter estirpes diferentes consoante a zona endémica do parasita da qual é isolada, podendo influenciar a sua detecção⁴².

Esta representação da *PfHRPII* foi conseguida pelo programa informático *Chimera 1.9*, através do código PDB 1L8M. Esta trata-se de um modelo teórico que contém todas as informações atómicas para poder ser gerada uma estrutura da proteína.

2.4. ANTICORPOS MONOCLONAIS ESPECÍFICOS: ANTI-*PfHSP70* (2E6) e ANTI-*PfHRPII*

Os anticorpos são moléculas produzidas no desencadear de mecanismos de defesa imunitária específica, em resposta à presença de um determinado antígeno. Nos órgãos linfoides, existem vários tipos diferentes de linfócitos B, cada qual reconhecendo um antígeno específico. Quando um tipo de linfócitos B é activado pelo antígeno para o qual possui receptores, este inicia o processo de diferenciação, transformando-se em anticorpos, que se libertam nos fluidos circulantes (sangue e linfa), e que se dirigem até ao local da infecção.

Os anticorpos englobam-se quimicamente no grupo das glicoproteínas e são também denominados num termo genérico por imunoglobinas (Ig). Existem 5 categorias de imunoglobulinas tendo em conta especificidades da sua estrutura e modo de acção – IgM, IgD, IgG, IgA e IgE. Neste trabalho serão utilizadas as Imunoglobulinas G. Estas proteínas são constituídas por 2 pares de cadeias polipeptídicas idênticas, 1 pesado e 1 leve, interligadas entre si por ligações dissulfídicas, apresentando a forma de um “Y”, como apresentado na Figura 2. 7. Os anticorpos IgG são moléculas com peso molecular aproximadamente de 150kDa, onde a cadeia pesada tem cerca de 50kDa e a leve 25kDa.

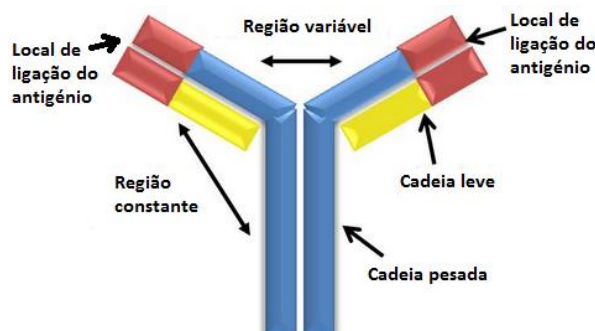


Figura 2. 7 – Representação esquemática de um anticorpo. Possui 2 cadeias pesadas e 2 cadeias leves, ligadas entre si por ligações dissulfídicas. Adaptado de ⁴³

É nos “braços” superiores do “Y” que se apresenta a sequência química variável, única para cada anticorpo, conferindo-lhe a sua especificidade. Um anticorpo possui duas funções distintas: ligar-se especificamente às moléculas do agente patogénico que introduziu a resposta imune e recrutar outras células e moléculas, com fim de destruir o patógeno, uma vez que o anticorpo se une a ele.

A produção dos anticorpos pode ser efectuada de duas maneiras: pode ser a partir de um único tipo de linfócito B, que é clonado e imortalizado, produzindo sempre os mesmos anticorpos, em resposta a um agente patogénico. Estes são denominados monoclonais e apresentam igual estrutura, especificidade e afinidade entre si, ligando-se por isso ao mesmo epítopo no antígeno. Por outro lado, existem os anticorpos policlonais, que são aqueles que derivam de diferentes linhagens de linfócitos B. Estes são uma mistura de moléculas de imunoglobulinas secretadas contra um antígeno específico, cada uma reconhecendo em epítopo diferente.

Ao longo deste trabalho serão usados dois diferentes IgG monoclonais, o anti-*PfHsp70* (2E6) e anti-*PfHRP*II, específicos para as duas proteínas em estudo, *PfHsp70* e *PfHRP*II respectivamente.

2.5. NANOTECNOLOGIA e NANOPARTÍCULAS DE OURO: PROPRIEDADES e APLICAÇÕES

Os termos nanotecnologia, nanociência, nanoestrutura e nanopartículas são cada vez mais emergentes na literatura científica. É devido à sua intensa aplicabilidade em diversas áreas que as nanopartículas têm sido alvo de muitos estudos. Um dos grandes avanços desta tecnologia tem-se reflectido em áreas da saúde, permitindo, por exemplo, efectuar detecções biológicas, controlar a entrega de fármacos no organismo e actuar como filtros ópticos e como sensores⁴⁴.

A principal razão do uso dos materiais à escala nano (10^{-9}m) é exactamente a que decorre da relação entre a sua área superficial e o seu volume. As reacções ocorrem à superfície dos materiais, ou das moléculas. Quanto maior for esta superfície, para o mesmo volume, maior será a sua reactividade. Ligando este conceito teórico à nanotecnologia: quanto mais pequenas forem as partículas, maior será o rácio entre a área superficial e o volume, tornando-as muito reactivas quimicamente, e promovendo maior eficiência nas ligações⁴⁵.

Posto isto, verificou-se que, à nanoescala, determinados materiais mostravam propriedades químicas e físicas diferentes daquelas que apresentavam à macro escala, nomeadamente os metais, despertando especial interesse para a sua utilização em diferentes

áreas⁴⁵. Os metais têm a característica de terem uma elevada densidade electrónica na sua superfície e uma forte absorção óptica. Na presença de um campo electromagnético de luz, os electrões entram em oscilação, que é característico da estrutura dos metais. Este processo é ressonante a uma frequência de luz característica e é designado por fenómeno de ressonância plasmónica de superfície localizada (LSPR, *Localized Surface Plasmon Resonance*)⁴⁶.

Estas frequências específicas de ressonância dependem de diversos parâmetros, como a composição, morfologia, concentração, temperatura, bem como da constante dieléctrica do meio envolvente, sendo que apenas se observam efeitos para alguns metais. Actualmente, o ouro e a prata são os metais que têm sido alvo de mais estudos, principalmente devido à sua elevada estabilidade química⁴⁷.

As nanopartículas têm cerca de 1-100nm⁴⁸ e possuem propriedades únicas. Actualmente, as nanopartículas de ouro (AuNPs) têm sido extensivamente estudadas devido às suas características, tais como as propriedades ópticas e electrónicas, elevada estabilidade, solubilidade em água e compatibilidade biológica, morfologia, dispersão e tamanho controláveis e ainda por apresentarem uma superfície para funcionalização muito simples⁴⁹. Desta forma, pretende-se usar todas estas propriedades à nanoescala para aumentar a sensibilidade, a capacidade de detecção, facilidade de operação e portabilidade para ensaios de biodetecção⁴⁷. Todas estas propriedades estão directamente relacionadas com o seu método de preparação, podendo controlar-se a sua composição, forma e tamanho durante a síntese⁵⁰.

O fenómeno LSPR, anteriormente mencionado e representado na Figura 2. 8 é originado pela interacção de duas componentes da luz, a componente eléctrica e a magnética, com os electrões livres presentes na superfície das nanopartículas, neste caso de ouro. A luz incidente vai desta forma provocar a vibração desses electrões, variando consoante a composição, tamanho e forma da nanopartícula, bem como a constante dieléctrica do meio, o que origina um pico máximo de absorção característico, a LSPR^{46,51}.

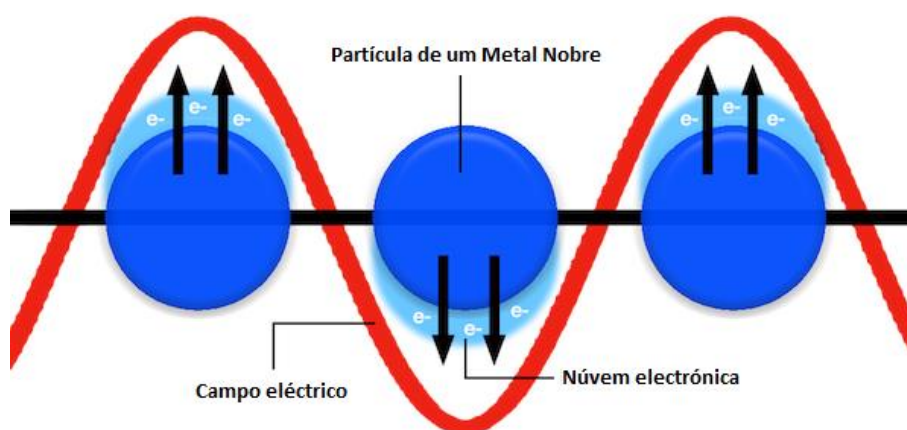
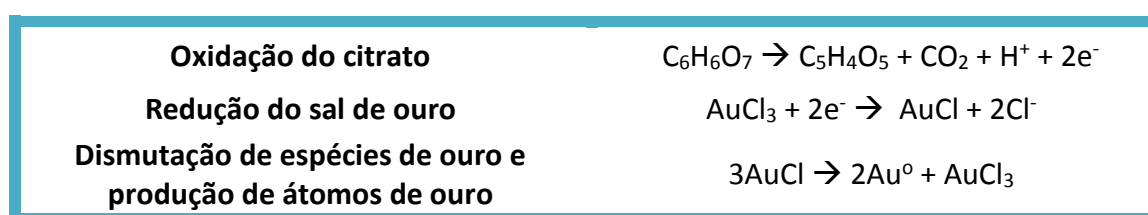


Figura 2. 8 – Esquema representativo do efeito da Plasmónica de Ressonância de Superfície Localizada ⁵².

Através da variação das características físico-químicas das nanopartículas de ouro é possível alterar a posição LSPR no espectro, isto é, alterar o comprimento de onda a que estas têm a absorvância máxima⁵¹. Por outro lado, o fenómeno de LSPR pode também ser alterado com a agregação das nanopartículas. A alteração da composição do meio, como por exemplo o aumento da força iónica, leva à formação de agregados, alterando assim a LSPR para comprimentos de onda maiores⁵¹.

O interesse do uso de nanopartículas de ouro é proeminente da ressonância óptica ser na gama do visível, da sua elevada sensibilidade em alterações ambientais, tamanhos e formas das partículas, bem como o campo de luz ser capaz de interagir com o sistema ressonante. Por conseguinte, dependendo das suas aplicações, exigem protocolos de síntese diferentes, de forma a originar partículas de formas e tamanhos bem definidos⁵³. Além da força do agente redutor, é crucial a acção de um estabilizador para a solução da síntese⁵³.

Neste trabalho, a síntese das AuNPs é baseada no método inicialmente proposto por Turkevich em 1951⁵⁴ e posteriormente desenvolvido por Kimling⁵³, para o qual é necessário um forte agente redutor e um estabilizador, de forma a prevenir a agregação das partículas. Neste método, a preparação das nanopartículas de ouro é feita através da redução aquosa de um sal de ouro, HAuCl_4 ($\text{Au}^{3+} \rightarrow \text{Au}^0$), pelo citrato de sódio, a 100°C e sob agitação vigorosa, segundo a Equação 1. 1.



Equação 1. 1 – Esquema das reacções de síntese das nanopartículas de ouro pelo método de Kimling⁵³

O citrato de sódio liga-se à superfície das nanopartículas de ouro e estabiliza os núcleos e reveste as nanopartículas, impedindo a agregação através de forças repulsivas. Estas forças podem ser devido a repulsões electrostáticas, exclusão estérica ou devido à formação de uma camada de hidratação (moléculas de água) na superfície da nanopartícula⁴⁸. O citrato estabiliza a nanopartícula e confere-lhe uma camada de moléculas igualmente carregadas à sua superfície. Ao mesmo tempo este agente redutor controla o crescimento das partículas em termos de tamanho e forma geométrica⁴⁸. O resultado final desta síntese será uma solução de nanopartículas de ouro com tamanho numa gama de 10 a 20nm, praticamente⁵³. Para AuNPs com cerca de 15nm, a solução coloidal apresenta um espectro de UV-Vis com uma banda de absorção com um máximo de absorvância a cerca de 520nm de comprimento de onda, característico da cor vermelha⁵⁵.

Uma solução de AuNPs pode encontrar-se num estado coloide, apresentando então a cor vermelha como já mencionado, ou pode encontrar-se num estado agregado cuja cor característica é um azul-arroxado, devido à deslocação da banda de SPR para comprimentos de onda maiores, na ordem dos 600nm⁵⁵, como demonstrado na Figura 2. 9. A mudança de cor observada é derivada da mudança da ressonância das partículas, que permite que sejam utilizadas como sondas ópticas, que está na base de diversas aplicações de detecção e diagnóstico⁵⁵.

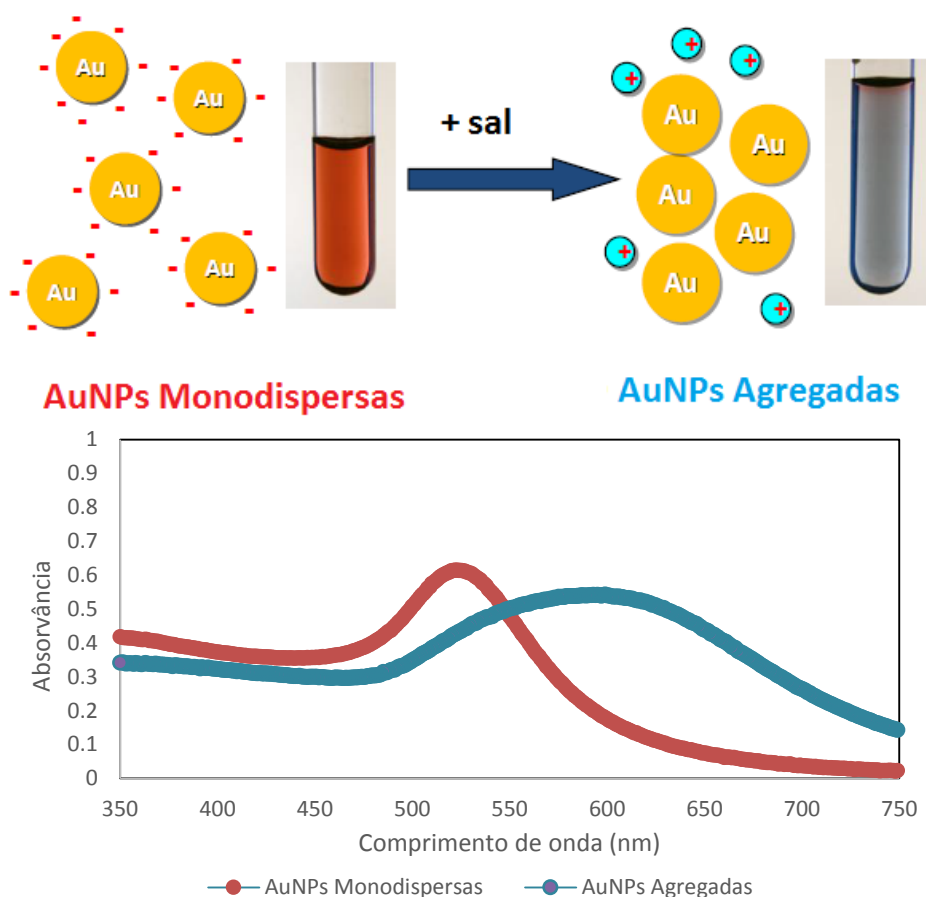


Figura 2. 9 - Agregação das AuNPs devido à adição de um sal. A solução de nanopartículas monodispersas apresenta uma cor vermelha, enquanto a solução de nanopartículas agregadas apresenta uma cor azul-arroxeadada⁵⁶. Nos espectros encontram-se curvas características de nanopartículas de ouro coloides e agregadas.

Este estado de agregação apresentado pelas AuNPs pode ser provocado por diversos factores: (1) ausência de uma molécula de revestimento suficientemente forte para estabilizar as nanopartículas, levando à sua agregação⁴⁸; (2) presença de soluções com elevadas concentrações de sal em que as nanopartículas começam a aproximar-se umas das outras possivelmente através de forças atractivas, como interacções de dipolo induzido (força de Van der Waals, pontes de hidrogénio), levando à sua agregação⁴⁸; (3) dependendo do ponto isoeléctrico (pI) das moléculas à superfície da nanopartícula e do pH da solução, as nanopartículas podem perder ou mudar a sua carga superficial⁴⁸.

Em ordem a aumentar a estabilidade das AuNPs, os ligandos à superfície das nanopartículas podem ser substituídos por outros que confirmem novas propriedades e funcionalidades à partícula. A funcionalização refere-se à modificação de uma superfície atribuindo características físicas, químicas e biológicas diferentes das originais presentes na superfície do material. Neste contexto, o citrato de sódio pode ser substituído por um ligando que se ligue mais fortemente à superfície da AuNP. Um dos exemplos mais comuns é o ácido 11-mercaptoundecanóico (MUA), representado na Figura 2. 10.

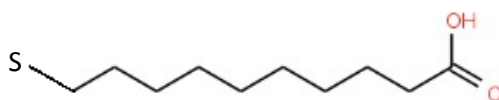


Figura 2. 10 – Representação da molécula de MUA, ácido 11-mercaptoundecanóico.

Os grupos tiol são considerados aqueles que têm maior afinidade para superfícies de metais nobres, em particular para o ouro. A ligação do átomo de enxofre ao átomo de ouro é classificada como covalente⁴⁸. Esta substituição do ligando à superfície permite o aumento da estabilidade das AuNPs em solução bem como a funcionalização da partícula promovendo a ligação de diversas moléculas, nomeadamente proteínas, através de ligações electrostáticas⁴⁸.

Do ponto de vista de aplicações *in vivo* as AuNPs não são praticamente tóxicas⁵⁰ e são de fácil funcionalização com ligandos apropriados. Estes ligandos fornecem uma solidez adicional onde o núcleo de ouro confere uma estabilidade ao conjugado, enquanto a monocamada de funcionalização permite o ajuste das propriedades à superfície, como a carga e hidrofobicidade⁵⁷.

2.5.1 BIONANOCONJUGADOS

A bioconjugação de nanopartículas coloidais é a extensão “natural” do conceito descrito de funcionalização química das partículas. Devido à excelente biocompatibilidade que as AuNPs apresentam, nos últimos anos têm sido alvo de elevado interesse na aplicação biológica⁵⁸. Na natureza existe uma vasta variedade de moléculas orgânicas disponíveis e possíveis para bioconjugação, que podem adoptar diferentes composições, comprimentos e complexidades. Exemplos incluem, por um lado, moléculas menores como lípidos, vitaminas, péptidos e açúcares, e, por outro lado, moléculas maiores como polímeros naturais incluindo proteínas, enzimas, DNA e RNA⁴⁸.

A conjugação das biomoléculas, neste caso de anticorpos, às nanopartículas de ouro gera materiais híbridos, denominados por bionanoconjugados, que permitem que as NPs interajam especificamente com os sistemas biológicos e se obtenha uma resposta, combinada pelas propriedades de ambos. O sistema nanopartícula-anticorpo adquire, em conjunto, funcionalidades únicas de ambos os materiais. Por exemplo, o pequeno tamanho das nanopartículas e a suas características ópticas (pois absorve na zona do visível) e magnéticas juntando à elevada capacidade dos anticorpos para reconhecimento específico e selectivo^{45,48}. Quando as biomoléculas são adsorvidas às NPs, a sua bioactividade é mantida⁵⁹.

Existem 3 principais tipos de estratégias adoptadas para a conjugação das biomoléculas às nanopartículas: (1) ligação à superfície da nanopartícula, geralmente através de adsorção química, usando grupos tiol, como é o caso do MUA; (2) adsorção electrostática das biomoléculas carregadas positivamente às nanopartículas carregadas negativamente e vice-versa; e (3) ligação covalente através da conjugação química, explorando os grupos funcionais tanto da partícula como da biomolécula⁴⁸.

É importante ter em atenção que a ligação das proteínas às nanopartículas depende de vários factores: a carga à superfície das partículas, que está directamente relacionada com a velocidade e com a capacidade de recobrimento das proteínas na superfície, onde nas neutras ocorre mais lentamente que nas carregadas; a hidrofobicidade, que influencia a cinética, o equilíbrio e a quantidade de proteína ligada; e o tamanho, morfologia e forma das partículas que também se relaciona com a quantidade de proteína ligada⁶⁰.

Neste trabalho, a proteína ligada à nanopartícula é um anticorpo monoclonal, e essa escolha decorreu do facto de a adsorção dos anticorpos à superfície das partículas ser normalmente um processo simples e que ocorre rapidamente⁶¹. Além disso, o seu uso advém também do facto de queremos detectar um antígeno, que liga especificamente ao anticorpo em

uso. As interacções mais relevantes para a adsorção do anticorpo em soluções aquosas são as hidrofóbicas, electrostáticas e pontes de hidrogénio. A adsorção e dessorção dos anticorpos às superfícies adsorventes são dependentes do tempo, da temperatura, da natureza da proteína e da superfície das nanopartículas, das forças iónicas, da concentração da proteína e da tensão que existe à superfície⁶¹.

Ao longo deste trabalho, os anticorpos foram conjugados à superfície das nanopartículas de ouro através de adsorção química, usando um grupo tiol, o MUA. Esta ligação promove a imobilização do anticorpo à superfície da AuNP, formando-se os bionanoconjugados AuNPs-MUA-Ab, utilizados no presente estudo.

2.5.2. RDTs BASEADOS NOS BIONANOCONJUGADOS

Os conjugados nanopartícula-anticorpo têm duas grandes e importantes aplicações médicas: a terapia e o diagnóstico, sendo nesta última que se baseia este trabalho. Testes de sensibilidade, bio-separação, imobilização enzimática, imunoensaios e purificações são as suas principais aplicações⁴⁵.

A grande vantagem do uso dos bionanoconjugados em testes de diagnóstico rápido decorre das propriedades que o ouro apresenta. Estas permitem fazer uma detecção colorimétrica rápida e visível que apenas depende da distância entre partículas no meio e das ligações que são formadas. Os anticorpos presentes à superfície das AuNPs actuam de forma muito selectiva, possibilitando a detecção da presença ou ausência do antígeno alvo, que, por sua vez, permite elaborar um diagnóstico correcto e rápido.

O ensaio desenvolvido utiliza como superfície de teste e de migração uma membrana de nitrocelulose ou o papel de filtro. Para a formação dos bionanoconjugados, as nanopartículas são inicialmente funcionalizadas com o MUA de forma a promover a ligação dos anticorpos anti-*PfHsp70* e anti-*PfHRPII*. O papel principal dos bionanoconjugados é o reconhecimento específico dos antígenos alvo, que se encontram em solução.

Na membrana irão existir duas linhas, nas quais funcionará o teste: numa linha está imobilizada a proteína que pretendemos analisar, que será a linha de teste; e na outra linha está imobilizado o anti-anticorpo específico do antígeno (ou anticorpo secundário, ou anti-IgG), que será a linha de controlo.

O antígeno a detectar na amostra liga-se especificamente às AuNPs-MUA-anticorpo (BNCs), em solução, devido à forte ligação entre anticorpo e antígeno específico. Posteriormente, a solução de bionanoconjugados com a amostra (fase móvel), é colocada na tira de teste e é absorvida através de um fluxo de capilaridade ao longo da membrana. Através de ligações competitivas, a solução a testar irá, ou não, ligar-se à linha de teste, dando-nos uma resposta negativa ou positiva, consoante o estado de infecção do paciente. Na Figura 2. 11 encontra-se representado um esquema do RDT desenvolvido.

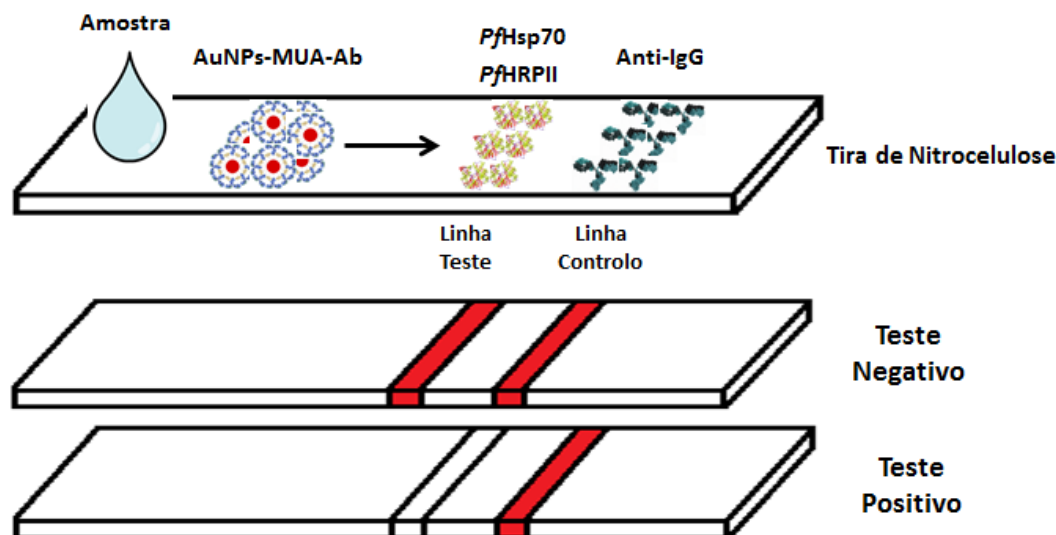


Figura 2. 11 – Esquema do RDT elaborado em tiras de nitrocelulose. Na linha de teste encontra-se imobilizada a proteína alvo, e na linha de controlo o anti-IgG.

Num teste negativo, a amostra não contém o antígeno alvo. Os bionanoconjugados vão migrar pela membrana na sua forma AuNPs-MUA-Ab, e ligam-se tanto na linha de teste, onde está imobilizado o antígeno alvo, como na linha de controlo, pela ligação do anticorpo ao anti-IgG, apresentando então 2 linhas de cor vermelhas. Num teste positivo, o antígeno alvo presente na amostra liga-se aos BNCs e quando estes migram através da membrana, não se ligam à linha de teste uma vez que os locais de ligação do anticorpo estão ocupados. Dessa forma, liga-se naturalmente à linha de controlo, apresentando então apenas 1 linha de cor vermelha.

2.5.3. WESTERN BLOT - APLICAÇÕES COM BIONANOCONJUGADOS

No presente trabalho foi utilizada a técnica de Western Blot com intuito de detectar a proteína PfHRP2 em amostras de culturas infectadas pelo parasita. O Western Blot consiste numa electroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE, *Sodium Dodecyl Sulfate - PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*) para separar as proteínas pelo seu peso molecular⁶². Posteriormente, as proteínas são transferidas para uma membrana, que normalmente é de nitrocelulose, através da aplicação de uma diferença de potencial, tornando a transferência rápida e eficiente. Quando o campo eléctrico é aplicado, as proteínas movem-se para fora do gel de poliacrilamida, para a superfície da membrana, onde ficam firmemente ligadas. Obtém-se com esta transferência uma membrana que é cópia do padrão de proteínas que originalmente estava apresentado no gel de poliacrilamida. De seguida, a membrana é bloqueada para prevenir ligações não específicas⁶³.

A forma mais comum para detecção de sinal é através de um método indirecto onde há inicialmente a ligação de um anticorpo primário à proteína alvo que está imobilizada na membrana e, de seguida, a ligação de um complexo anticorpo secundário-enzima (normalmente anti-IgG-HRP (HorseRadish Peroxidase)), que se irá ligar ao anticorpo primário. De seguida é adicionado um substrato à enzima, que promoverá a produção de um produto detectável, como demonstrado na Figura 2. 12.

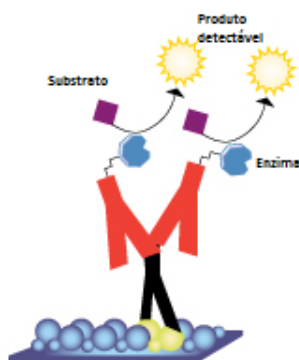


Figura 2. 12 – Representação esquemática de detecção de um sinal através de um método indirecto no ensaio de *western-blot*, utilizando um anticorpo primário e um secundário que está complexado com uma enzima. Através da adição de um substrato, a enzima emite um sinal detectável. Adaptado de⁶⁴

O método mais sensível e comum para a detecção do sinal emitido por enzimas utiliza um substrato quimioluminescente que reage com a enzima, normalmente uma peroxidase, produzindo uma (bio)luz denominada quimioluminescência. Esta pode ser capturada por meio de uma película fotográfica numa câmara escura.

Uma alternativa a este método baseia-se na detecção de proteínas específicas presentes numa amostra utilizando directamente os bionanoconjugados. Desta forma, há o reconhecimento específico, num só passo, do anticorpo presente na superfície das AuNPs ao antígeno alvo imobilizado na membrana. Quando ocorre o reconhecimento, há a formação de uma banda vermelha na zona onde se encontra a proteína, indicando a sua presença. Na Figura 2. 13 está representado o esquema da elaboração de um *western-blot* utilizando os bionanoconjugados.

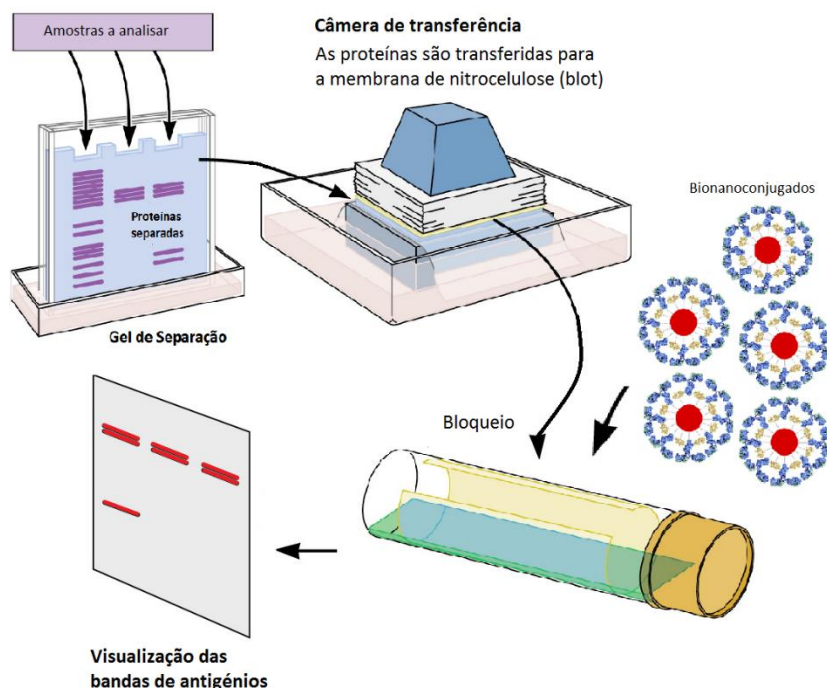


Figura 2. 13 - Representação esquemática do ensaio de *Western-Blot* utilizando bionanoconjugados. Adaptado de⁶⁵

Desta forma, pretende-se também confirmar a ligação específica de um determinado anticorpo a um antígeno, através do aparecimento da banda vermelha proveniente da ligação. Para interpretar os resultados foram elaborados os métodos de quimioluminescência e dos bionanoconjugados (AuNP-MUA-Ab).

Página em Branco

CAPÍTULO III: MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. PRODUÇÃO, EXPRESSÃO e PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE *Plasmodium falciparum*

3.1.1. *PfHsp70*

O protocolo de produção da proteína *PfHsp70* recombinante foi executado segundo Matambo *et al*³⁷ embora com algumas alterações.

O Doutor Tonderayi Matambo (*Rhodes University*, Africa do Sul) cedeu gentilmente o plasmídeo utilizado para a expressão da proteína *PfHsp70*. Para a transformação, o plasmídeo foi inserido em células de *E. coli Rosetta Blue™* pelo Doutor Gonçalo Doria e pelo Mestre Bassem Guirgis, FCT-UNL.

Resumidamente, para a transformação, 10ng do plasmídeo pQE30/*PfHsp70* foram adicionados a 20μL de células de *E. coli Rosetta Blue™* e estas foram depois incubadas em gelo durante 5 minutos. Seguidamente foram aquecidas a 42°C durante 30 segundos e colocadas novamente em gelo durante 2 minutos. O meio SOC (*Super Optimal Broth medium* (SOB) com repressor catabólico), neste caso, meio SOB com glucose (*Sigma-Aldrich*), foi adicionado à mistura e incubado durante 1h, a 37°C e a 250rpm na incubadora (*Gallenkamp*), de forma a tornar a transformação do plasmídeo mais eficiente⁶⁶. A selecção dos transformantes foi confirmada pelo crescimento de bactérias em meios com antibiótico (100μg/mL de ampicilina (*Sigma-Aldrich*), 34μg/mL de clorofenicol (*Sigma-Aldrich*) e 12,5μg/mL de tetraciclina (*Sigma-Aldrich*)) quando incubadas *O.N.* a 37°C.

Inicialmente, de forma a obter colónias isoladas procedeu-se à inoculação de colónias de *PfHsp70* numa placa de Petri com meio LBagar (*Merck*), contendo o antibiótico já usado para confirmação da transformação. Incubou *O.N.* a 37°C. Após crescimento a placa de Petri é guardada a 4°C.

Verificou-se o aparecimento de colónias isoladas, sendo que uma delas foi usada para preparar 50mL de meio LB (10g/L bactotryptone [*Dickinson and Co.*], 5g/L bactoyeast extract [*Dickinson and Co.*], 10g/L NaCl [*Sharlau*]) e com as mesmas concentrações de antibióticos mencionados anteriormente. Deixou-se o pré-inóculo a incubar *O.N.*, a 37°C e a 210rpm.

Após incubação, estes foram diluídos adicionados a total de 2L de meio LB fresco com os antibióticos característicos, permitindo o crescimento das bactérias. Na incubadora a 37°C, agitou a 210rpm, até atingir uma densidade óptica (OD, *Optical Density*) entre 0,5 – 0,6, a 600nm. Quando o crescimento da bactéria atingiu a OD pretendida, foi induzido com IPTG (99%, dioxan free, NZYTech) com uma concentração final de 1mM e deixou-se a incubar durante 16h, a 37°C e a 210rpm.

Os crescimentos induzidos resultantes foram centrifugados durante 30 minutos, a 4°C e a 14300 x g (Centrifuga *Beckman Coulter Avanti J26-XPI*, rotor JA10). O sedimento foi ressuspensionado em 20mL tampão de lise (8M Ureia (*Panreac*)), 300mM NaCl, 10mM Imidazole (*Sigma-Aldrich*), 10mM Tris (*Carlo-Erba*), pH 8, 1mM de lisosima (*Sigma*), 800μL cocktail de inibidor de protease). De seguida adicionou-se um pouco de DNase, homogeneizou-se a solução e levou-se à *French*

Press (French pressure cell press, Thermo Electron Corporation, Alemanha), fazendo 3 passagens à pressão 2.000 psi, de forma a promover o rompimento das membranas.

Os restos celulares foram removidos através da centrifugação (*Centurion Scientific K3 Series*, rotor BRK5308) durante 90 minutos, a 4°C e a 4200 x g, e o sobrenadante foi recolhido para posterior purificação.

Para proceder à purificação da proteína *PfHsp70* foi utilizada uma resina de Níquel-NTA (*Qiagen*), previamente equilibrada com 2 volumes de tampão de lavagem (10mM Imidazole, 300mM NaCl, 10mM Tris pH 8.0, 800μL de cocktail inibidor de protease). Misturou-se 10mL da resina a cada 20mL de sobrenadante recolhido anteriormente, a 4°C, durante 2h, com uma agitação ligeira. Compactou-se a resina e adicionou-se tampão de lavagem até ser atingida uma OD de 0,1, a 280nm, garantindo que todas as proteínas ligadas não especificamente à coluna são eliminadas da mesma. Uma vez atingido este valor, iniciou-se a adição de tampão de eluição (100mM Imidazole, 300mM de NaCl, 10mM Tris pH 8, 800μL de cocktail inibidor de protease), usado para desagarrar a cauda de histidinas presente na proteína *PfHsp70* da resina, eluindo-a da coluna. São recolhidas fracções contínuas até a OD ser constantemente inferior a 0,1, a 280nm, com uma linha de base de tampão de eluição, com auxílio de um espectrofotómetro *Cary* (modelo 50, versão 3.0).

Foi efectuada uma troca de tampão das amostras recolhidas de forma a remover o imidazole da solução de proteína, uma vez que este pode induzir agregação⁶⁷, para o tampão Borato de Sódio (100mM NaCl, 150mM Tris pH 8). A troca foi feita através do uso de centricons (MWCO 30kDa, Amicon-ultra, Milipore), centrifugando-se (rotor BRK5308) por ciclos de 5 minutos, a 7500 x g e a 4°C.

Para a determinar a concentração final da proteína *PfHsp70* obtida procedeu-se ao método de BCA (*Bicinchoninic acid assay*). De forma a analisar a pureza da mesma foi efectuado um gel de SDS-PAGE 10% (*Sodium Dodecylsulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis, Panreac*). As amostras foram preparadas através da adição de 10μL da amostra a 10μL de tampão de amostra e fervidas a 100°C por 7 minutos. Estas foram colocadas no gel e corridas a 150V durante cerca de 50 minutos com um sistema de tampão Tris-Glicina e com um suporte da BioRad.

As alíquotas finais foram guardadas a -20°C.

3.1.2. *PfHRPII*

O processo de produção de *PfHRPII* recombinante baseou-se no descrito por *Ndonwi et al*⁶⁸.

O Doutor Daniel Goldberg (*Washington University, EUA*) cedeu amavelmente o plasmídeo utilizado para a expressão da proteína *PfHRPII*, que foi enviado na forma liofilizada num papel de filtro.

Segundo a Doutora Inês Gomes, ao plasmídeo liofilizado adicionou-se tampão de extração (1mM EDTA, 10mM Tris-HCl e pH 7,0) e centrifugou-se a 22.000 x g durante 1 minuto, de forma a partir as fibras do papel de filtro. Ao sobrenadante foram adicionados 2 volumes de etanol absoluto frio (*Panreac*) e acetato de sódio 3M (*Riedel-de Haën*) e deixou-se *O.N.* a -20°C. No dia seguinte, a solução foi centrifugada durante 20 minutos a 4°C, ressuspendeu-se o sedimento em etanol 70% (*Panreac*) e frio, e centrifugou-se novamente a 22.000 x g durante 20 minutos, a 4°C.

Ao sedimento foi adicionada água autoclavada e deixou-se durante 2h a 4°C. Por fim é determinada a concentração de plasmídeo obtido usando um espectrofotómetro Nanodrop (*Thermo scientific Nanodrop 2000C*).

Para transformar as células das estirpes de *E. coli* BL21, misturaram-se as células e o plasmídeo com uma proporção de 5:1 e deixou-se a mistura no gelo durante 50 minutos. Seguidamente a mistura foi colocada a 42°C durante 90 segundos, e, depois, novamente em gelo durante 5 minutos. Adicionou-se meio SOC à mistura e incubou-se durante 1h, a 37°C e a 250rpm. Adicionaram-se então as células a uma placa contendo meio LBagar e ampicilina 100µg/mL. Deixou-se incubar *O.N.* a 37°C.

Inicialmente, de forma a se obter colónias isoladas procedeu-se à inoculação do *PfHRPII* em meio LBagar, contendo ampicilina 100µg/mL que incubou *O.N.* a 37°C.

Verificou-se o aparecimento de colónias isoladas e adicionou-se uma delas a uma solução de 50ml de meio LB, o qual continha ampicilina 100µg/mL. Deixou-se o pré-inóculo *O.N.* na incubadora a 37°C e 210rpm.

Após incubação, 200µL do pré-inóculo são adicionados a uma solução de 2L de meio LB, com ampicilina 100µg/mL, que incubou, a 37°C e a 210 rpm, até atingir uma densidade óptica de 0,75 – 0,9, a 600nm. Ao ser atingida a OD desejada, garante-se que as células se encontram na fase exponencial. Nesta altura foi adicionado o agente indutor IPTG numa concentração de 0,05mM, para que a expressão da proteína fosse iniciada. Após 20 horas de indução a 16°C e 180rpm, a solução foi centrifugada para que no sedimento ficassem apenas as células bacterianas produzidas, separando-as do meio líquido de crescimento.

O crescimento resultante foi centrifugado durante 40minutos, a 4°C e a 18.000 x g (Centrifuga *Beckman Coulter Avanti J26-XPI*, rotor JA10). O sedimento foi ressuspenso em tampão de ligação (50mM Imidazole, 500mM NaCl, 20mM Tris pH 8, 800µL cocktail de inibidor de protease. De seguida adicionou-se um pouco de DNase e levou-se à *French Press*, fazendo 3 passagens a 2.000 psi, de forma a promover o rompimento das membranas celulares.

Depois da lise, a solução foi centrifugada (rotor BRK5308) durante 90 minutos, a 4°C e a 4.200 x g, de forma a separar os resíduos insolúveis, nomeadamente restos celulares, e recuperou-se o sobrenadante.

Para proceder à purificação da proteína *PfHRPII* foi utilizada uma resina de Ni-NTA, previamente equilibrada com 5 volumes de tampão de ligação. Misturou-se a resina com o sobrenadante anterior, a 4°C, durante 2h com agitação lenta (P Selecta). Compactou-se a resina e adicionou-se tampão de lavagem (250mM Imidazole, 500mM de NaCl, 20mM Tris pH 8) até ser atingida uma OD inferior a 0,1, a 280nm. Uma vez atingido este valor iniciou-se a adição de tampão de eluição (1M Imidazole, 500mM de NaCl, 20mM Tris pH 8) de forma a recolher a proteína, até ser novamente atingida uma OD inferior a 0,1, a 280nm. Todo o procedimento efectuado desde o passo do crescimento do pré-inóculo até à passagem da amostra pela coluna de purificação está representado na Figura 3. 1.

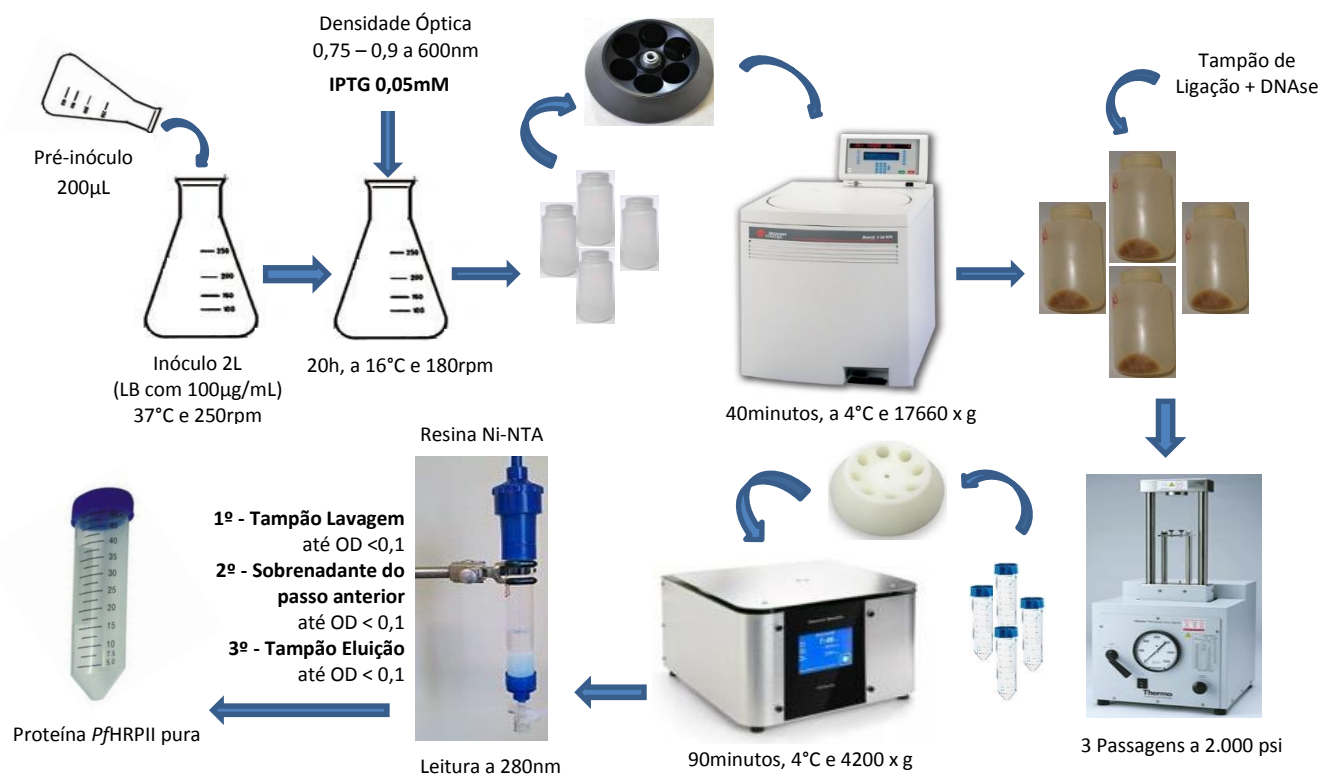


Figura 3. 1 – Representação esquemática do processo de produção e purificação da proteína PfHRP2 desde o crescimento até à purificação.

Analisando os valores de OD obtidos, juntaram-se as fracções que continham a proteína e foram colocadas em *centricons* com tamanho dos poros da membrana de 3kDa (membrana *Milipore*), a 4°C, de forma a concentrar e trocar o tampão para TBS (150mM NaCl, 50mM Tris pH 7,4).

Para determinar a concentração final da proteína PfHRP2 obtida procedeu-se ao método de BCA e, de forma a analisar a pureza, foi efectuado um gel 10% SDS-PAGE. As amostras foram preparadas através da adição de 10µL da amostra a 10µL de tampão de amostra e fervidos a 100°C durante 7 minutos. As amostras foram colocadas no gel e corridas a 150V durante cerca de 50 minutos com um sistema de tampão Tris-Glicina e com um suporte da BioRad.

As alíquotas finais foram guardadas a -20°C.

3.2. PRODUÇÃO e PURIFICAÇÃO DE ANTICORPO MONOCLONAL

3.2.1. Anti-PfHsp70, 2E6

Para os ensaios imunológicos é necessário utilizar um anticorpo que reconhece especificamente o antígeno PfHsp70. Este anticorpo é designado por anti-PfHsp70, ou 2E6.

De acordo com o Dr. Miguel Prudêncio e Dr. Cláudia Cunha, do Instituto de Medicina Molecular (IMM), Portugal, a produção do anticorpo foi feita através de uma cultura de hibridomas que foi incubada utilizando condições de produção normais de *scale-up* para 2,6L de cultura contendo o anticorpo monoclonal⁶⁹.

A precipitação da proteína foi efectuada utilizando uma solução de sulfato de amónia, 50% p/v, a 4°C. O precipitado foi recolhido através de centrifugação e posteriormente

ressuspendido em tampão PBS (fosfato-salino, *Phosphate Buffered Saline*). O excesso de sal foi removido através de diálise durante 2 dias usando uma membrana com poros entre 12 e 14kDa (*Medicell International, UK*) obtendo-se no final cerca de 100mL de anticorpo impuro. Este é guardado a -4°C até se ser purificado.

Uma vez que para o estudo é necessário o anticorpo na sua forma pura, foi necessário realizar a sua purificação usando uma cromatografia de afinidade com coluna de Proteína G. Antes de se iniciar a purificação do anticorpo, este foi centrifugado durante 30 minutos, a 4°C e a 6.000 x g, de forma a eliminar qualquer precipitado. O sobrenadante foi concentrado até 35mL por ultrafiltração com uma agitação leve, a 4°C (membrana com poro de 30kDa).

De seguida foi efectuado o método BCA para se estimar a concentração do anticorpo de forma a se poder calcular a quantidade máxima de anticorpo a adicionar à coluna, tendo em conta as indicações do fabricante⁷⁰.

A purificação do anticorpo 2E6 foi realizada através do uso de uma coluna *Fast Flow* com resina de Proteína G Sepharose™ (GE *Healthcare*, 17-0618-01, Upsala, SE). A proteína G é uma proteína bacteriana de *Streptococcus* do grupo G que tem uma elevada afinidade para os anticorpos IgG. Desta forma, quando a amostra elui ao longo da coluna, todas as IgG's ficarão adsorvidas à resina. As colunas com resinas de proteína G têm a grande vantagem desta se ligar a uma grande variedade de IgG's de espécies eucariotas, bem como a diferentes subtipos de IgG⁷¹.

A resina de 10mL foi adicionada a uma coluna cilíndrica e equilibrada com 5 a 10 volumes de tampão de ligação (20mM fosfato de sódio (*Sigma-Aldrich*), pH 7). Seguidamente, foram adicionados à coluna 3mL de anticorpo impuro. Lavou-se a coluna utilizando tampão de ligação até a OD ser constantemente abaixo de 0,1, a 280nm. Neste ponto, adicionaram-se cerca de 6 volumes de tampão de eluição (0,1M glicina (99,7%, *Sigma-Aldrich*) -HCl, pH 2,7) e recolheu-se o eluído para um tubo de ensaio contendo cerca de 200μL (0,25 volumes) de tampão de neutralização (1M Tris-HCl pH 9) por mililitro de anticorpo eluído. Depois de sair todo o anticorpo da coluna, esta é lavada com 2-3 volumes da coluna de tampão de ligação e o processo repete-se até que todo o volume de anticorpo impuro passe na coluna.

Após a eluição de todo o anticorpo, a resina foi regenerada com 2 a 3 volumes de tampão de eluição seguido de 2 a 3 volumes de tampão de ligação e guardadas a 4°C.

Com o processo de purificação do anticorpo concluído, procedeu-se à concentração do mesmo assim como à troca de tampão da solução (neutralização e eluição) para tampão fosfato de sódio 20mM e pH 7, utilizando um sistema *centricon* (*Milipore*, membrana com poros 30kDa), centrifugando por períodos de 5 minutos a 7500 x g, a 4°C, até se atingir o volume pretendido.

Para determinar a concentração final do anticorpo procedeu-se ao método de BCA e de forma a analisar a pureza foi efectuado um gel 12% SDS-PAGE. As amostras foram preparadas através da adição de 10μL da amostra a 10μL de tampão de amostra e fervidos a 100°C durante 2 minutos. As amostras foram colocadas no gel e corridas a 150V durante cerca de 50minutos com um sistema de tampão Tris-Glicina e com um suporte da BioRad.

As alíquotas finais foram guardadas a -20°C.

3.2.2. Anti-PfHRPII

Para os ensaios imunológicos é necessário utilizar um anticorpo específico para antígeno a utilizar que, para o caso da PfHRPII, é o anticorpo anti-PfHRPII. Este foi obtido comercialmente no sítio *antibodies-online.com* e não necessita de purificação adicional.

3.3. SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE OURO (AuNPs)

A síntese das nanopartículas de ouro (AuNPs) utilizada durante o trabalho foi baseada no método de *Turkevich*⁵⁴ e posteriormente desenvolvido por *Kimling*⁵³, com ligeiras alterações⁷². Todo o material utilizado foi previamente mergulhado em água-régia (Ácido Nítrico, HNO₃ [Panreac], e Ácido Clorídrico, HCl [Panreac], 1:3) durante a noite e, no dia seguinte, rigorosamente bem lavado com água mili-Q, podendo-se assim iniciar o processo de síntese.

Num balão de fundo redondo de 500mL foram adicionados 250mL de água mili-Q e 173μL de Ácido Tetracloroaurico, HAuCl₄ (1,445mM, preparados a partir de uma solução de cloreto de ouro 30% wt, 99,9%, *Sigma Aldrich*). Foi adaptado um condensador ao balão e a solução foi submetida a um aquecimento sob refluxo utilizando uma placa de alumínio (P Selecta) sob uma com agitação vigorosa. Quando a solução entrou em ebulição, foi adicionada rapidamente uma solução de 25mL de citrato de sódio (36,8mM, 1% p/v, *Sigma*). Após esta adição, a solução mudou imediatamente de uma cor amarela característica de complexos de ouro, para incolor, seguida de preto (possivelmente azul escuro) e finalmente vermelha, característico da formação de nanopartículas de ouro esféricas (com tamanhos entre 10 e 20nm), como demonstrado na Figura 3. 2. A solução continuou sob aquecimento e agitação durante mais 15 minutos e, seguidamente, arrefeceu à temperatura ambiente com uma ligeira agitação. A solução de AuNPs foi caracterizada por espectroscopia de UV-Vis, e armazenada a 4°C, no escuro, para utilizações posteriores.

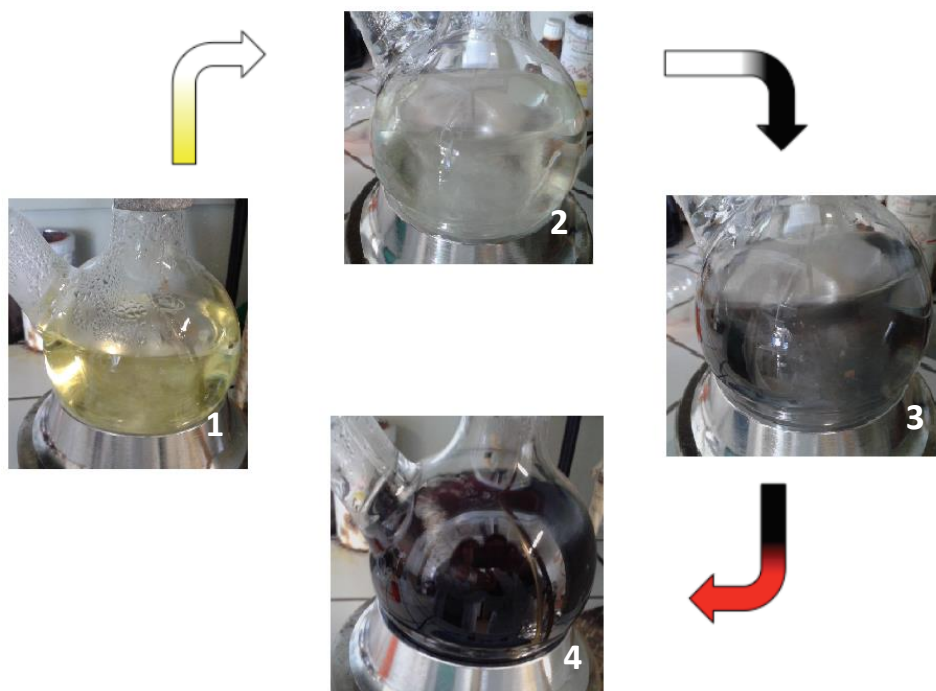


Figura 3. 2 - Mudanças de cor durante a síntese de nanopartículas de ouro. A solução inicial de ouro (III) (1) torna-se incolor após adição do citrato (2). Poucos segundos depois a solução fica preta/azul escura (3) e, finalmente, vermelha (4) indicando a formação de uma solução coloidal de nanopartículas de ouro.

Através deste método, a solução final de AuNPs coloides apresentam uma banda de LSPR característica a cerca de 520nm, característico de formas esféricas de ouro entre 10 e 20nm.

Neste estudo foram também utilizadas AuNPs de 48nm, foram sintetizadas pelo Mestre Miguel Peixoto do grupo da Professora Eulália Pereira, REQUIMTE, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, nossos colaboradores.

3.3.1. CARACTERIZAÇÃO DAS AuNPs

Para caracterizar as nanopartículas de ouro e os bionanoconjugados, é usada a espectroscopia de UV-Vis. Através dos espectros obtidos é possível efectuar a avaliação e comparação das amplitudes de bandas e calcular as razões de agregação relacionados com a estabilidade dos coloides, bem como detectar os desvios da banda de SPR após conjugação.

Adicionalmente, com recurso à espectroscopia de UV-Vis é possível estimar o diâmetro e a concentração das AuNPs de acordo com o método descrito por *Haiss et al*⁷³.

O método relaciona a absorção máxima da LSPR da solução coloide de AuNPs com a sua absorção aos 450nm, fazendo o quociente da primeira pela segunda. Este valor é utilizado para determinar directamente o tamanho da nanopartícula de ouro, o qual corresponde um coeficiente de extinção molar, ϵ ($M^{-1}cm^{-1}$), tabelado⁷³ e específico para 450nm (ϵ_{450nm}).

Com todos os valores determinados, estes podem ser substituídos na equação proposta por *Haiss*⁷³, representada na Equação 3. 1, e determinada a concentração das AuNPs.

$$C = \frac{A_{450} \times l}{\epsilon_{450}}$$

Equação 3. 1– Equação para determinar a concentração das AuNPs esféricas, fazendo a divisão entre o produto da Absorvância a 450nm com o comprimento do percurso óptico, e o Coeficiente de Extinção Molar, ϵ , a 450nm.

Todos os espectros de UV-Vis foram registados utilizando células de quartzo com 1cm de comprimento de percurso óptico (Hellma, Germany), com um intervalo de comprimento de onda entre 200 e 800nm, usando um espectrofotómetro UV-Vis.

3.4. FUNCIONALIZAÇÃO DAS AuNPs COM O ÁCIDO MERCAPTOUNDECANÓICO (MUA)

De forma a alterar a natureza química da superfície das AuNPs, o citrato de sódio, agente de revestimento utilizado aquando da síntese de AuNPs, é substituído pelo MUA (*Aldrich*). Esta molécula contém grupos tiol que têm uma maior afinidade com a superfície de ouro comparativamente com os grupos carboxilo do citrato, alterando desta forma o revestimento à superfície das nanopartículas de ouro. Além disso, o MUA actua como uma molécula bifuncional uma vez que actua como agente de revestimento e promove a imobilização do anticorpo à superfície das AuNPs, através de ligações electroestáticas.

O volume apropriado de MUA 10mM (solução de etanol absoluto) foi adicionado ao coloide de AuNPs com razões molares de AuNPs:MUA de 1:5000 e 1:40000, para as AuNPs de 17nm e 48nm, respectivamente, com um tempo de incubação de 1h, a 4°C.

A funcionalização das AuNPs com MUA foi comprovada através de espectroscopia de UV-visível pelo desvio da banda de SPR de 2/3 nm.

3.5. FORMAÇÃO DOS BIONANOCONJUGADOS (AuNPs-MUA-anti-PfHsp70/PfHRPII)

Num procedimento típico, a 30mL da solução de AuNPs 2,5nM (partículas 17nm) previamente funcionalizadas com MUA, adicionou-se a solução de anticorpo com razões molares de AuNPs-Ab de 1:25 e 1:125 para AuNPs de 17nm e 48nm, respectivamente. Para as partículas de 48nm a concentração da solução inicial foi a da solução *stock* que estava a 0,11nM. A solução incubou durante a noite a 4°C, formando-se assim os bionanoconjugados (AuNPs-MUA-Ab).

O volume da solução de bionanoconjugados (AuNPs-MUA-Ab) é distribuído em *ependorfs* de 1,5mL e centrifugado durante 20 minutos, a 4°C e a 16000 x g. O sedimento foi ressuspensionado em 200µL numa solução de BSA 10mg/mL (solução aquosa) e incubado durante 60 minutos no escuro a 4°C. Este passo corresponde ao bloqueio dos bionanoconjugados de forma a evitar que haja interações não específicas de antígeno com as AuNPs-Ab. Após a incubação, foi efectuada uma nova centrifugação durante 20 minutos, a 4°C e a 16000 x g. De seguida o sedimento foi ressuspensionado em 250µL de solução tampão fosfato de sódio 5mM pH 7,2 e novamente centrifugado durante 10 minutos, a 4°C e a 16000 x g. Para finalizar, o sedimento foi ressuspensionado novamente em tampão fosfato de sódio 5mM pH 7,2 para um volume total final de 5mL para as AuNPs de 17nm (≈15nM de concentração final) e num volume final de cerca de 3mL para as AuNPs de 48nm (≈1,32nM de concentração final). Finalizado o processo, é traçado um espectro UV-Vis entre 200 e 800nm para confirmar a estabilidade da solução.

As concentrações finais obtidas, definidas para os Bionanoconjugados de 17nm e 48nm, foram ajustadas de forma a corresponder à mesma absorvância máxima na LSPR num espectro UV-Vis.

Os vários tempos de lavagens que se utilizavam no protocolo anterior para a formação dos bionanoconjugados no Bionanolab, foram optimizados nesta dissertação de forma a reduzir o tempo de preparação dos mesmos. Os tempos apresentados neste procedimento são já os optimizados.

3.6. ESTABILIDADE DAS NANOPARTÍCULAS e DOS BIONANOCONJUGADOS:

Procedendo ao quociente entre os valores de absorvância a 600nm (banda característica de agregação das partículas) e os valores de absorvância da LSPR (para AuNPs de 17nm cerca de 520nm, banda característica de um coloide de partículas) é possível verificar a estabilidade da solução das nanopartículas de ouro e dos bionanoconjugados. A estabilidade das soluções foi estudada através da variação da força iónica, com o uso do sal cloreto de sódio (NaCl), e através da variação do pH do meio envolvente, com recorrência a uma solução de 1M HCl e uma de 1M NaOH. Os testes foram realizados para 4 soluções diferentes: nanopartículas de ouro funcionalizadas com citrato (AuNPs-citrato); nanopartículas de ouro funcionalizadas com MUA (AuNPs-MUA); nanopartículas de ouro funcionalizadas com MUA e revestidas com anticorpo, sem bloqueio da proteína BSA (AuNPs-MUA-Ab); e nanopartículas de ouro funcionalizadas com MUA,

revestidas com anticorpo e com bloqueio da proteína BSA (AuNPs-MUA-Ab(BSA)). Quando foi adicionada a quantidade de sal ou ajustado o valor pH pretendido, foi cumprido rigorosamente um tempo de 2 minutos antes da medida de absorvância.

NOTA: Os termos AuNPs-MUA-Ab e AuNPs-MUA-Ab(BSA) foram apenas utilizados neste ponto para diferenciar no estudo da estabilidade. À excepção desta secção, sempre que mencionado AuNPs-MUA-Ab refere-se a Bionanoconjugados bloqueados com BSA (a menos que seja referido o contrário)

3.6.1. COM VARIAÇÃO DA FORÇA IÓNICA

Através da adição de diferentes quantidades de sal NaCl é possível obter diferentes forças iónicas finais em solução, e assim estudar a estabilidade dos conjugados nas suas diferentes formas. Mantendo a concentração de AuNPs constante, variou-se a força iónica entre 0 e 2M.

3.6.2. COM VARIAÇÃO DO pH DO MEIO

Através da adição de diferentes quantidades de HCl (ácido) e NaOH (base) é possível obter diferentes valores de pH final em solução, e assim estudar a estabilidade dos conjugados nas suas diferentes formas. Mantendo a concentração de AuNPs constante, variou-se o valor de pH entre 2 e 8. Os valores de pH foram medidos com recurso a um medidor de pH (pH-meter basic 20+, Crison).

3.7. ENSAIOS IMUNOCROMATOGRÁFICOS EM TIRAS DE NITROCELULOSE e PAPEL DE FILTRO

Numa tira de nitrocelulose com cerca de 2cm x 5cm foi colocada numa extremidade uma gota de 5µL de anti-IgG diluído 25 vezes, na outra, colocar uma gota de 5µL de *PfHsp70* ou *PfHRPII* 0,25mg/mL. O esquema de deposição das gotas nas tiras de nitrocelulose (BIO-RAD 0,2µm) está representado na Figura 3. 3. Deixou-se as gotas secar ao ar, de forma a garantir que ficam imobilizadas na membrana ou no papel de filtro. Após secagem, mergulhou-se a tira nitrocelulose numa solução de BSA 10mg/mL até ficar toda embebida na solução, com respectiva secagem. Quando a tira se encontrar completamente seca, é mergulhada numa solução de bionanoconjugados durante cerca de 1 minuto, deixa-se secar ao ar e analisam-se os resultados obtidos.

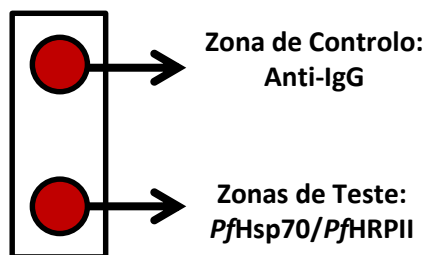


Figura 3. 3 – Esquema da deposição das gotas na tira de nitrocelulose para a elaboração do RDT.

No caso de se usar a superfície de papel de filtro (*Whatman* n°1), cedido pela Professora Doutora Elvira Fortunato, do CENIMAT-13N FCT-UNL, as gotas (que são compostas sob as mesmas condições utilizadas na nitrocelulose) são imobilizadas nas linhas delimitadas e não há o passo de bloqueio com a solução de BSA. O papel de filtro é impresso com canais de cera, com auxílio de uma impressora (*Xerox ColorQube* 8570), como demonstrado na Figura 3. 4.

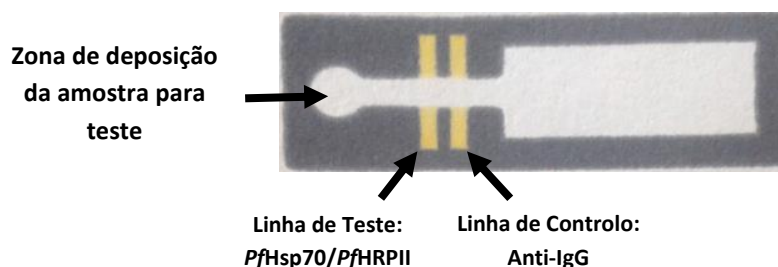


Figura 3. 4 - Esquema da deposição das gotas no papel de filtro com canais de cera impressos para elaboração do RDT.

Após a secagem das gotas, 50µL da solução de bionanoconjugados é depositada no papel, no reservatório destinado à deposição da amostra. Esta vai migrar ao longo da superfície.

Para simular resultados positivos (infecção com malária), quantidades definidas de antígeno alvo (*PfHsp70* ou *PfHRPII*) foram adicionadas à solução de bionanoconjugados.

3.8. TÉCNICAS GERAIS

3.8.1. ELECTROFORESE EM GEL DE POLICRILAMIDA - SDS-PAGE

A electroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes, SDS-PAGE, um detergente aniónico, é utilizada para analisar a pureza dos antígenos (gel 10%) e dos anticorpos (gel 12%), assim como para determinar a sua massa molecular (Ver anexo 1). Os géis são constituídos por acrilamida/bisacrilamida numa proporção de 37,5:1.

A 10µL da amostra a analisar foram adicionados 20µL de tampão de amostra (20% v/v glicerol; 10mM Mercaptoetanol; 10% p/v SDS, 0,5M Tris-HCl, pH 6,8; 0,05% p/v azul de bromofenol). As misturas foram aquecidas a 100°C durante 2 minutos. Foram utilizados marcadores de altos e baixos pesos moleculares (*Bio-RAD LMN Range*). Os géis foram mergulhados em tampão de corrida (1,92M glicina, 0,25M Tris e 1% p/v SDS), as amostras depositadas nos poços correspondentes, e foi aplicada uma corrente de 150V durante cerca de 50 minutos.

Quando terminou a corrida, os géis foram corados utilizando uma solução corante (azul coomassie 0,5% p/v) durante 30 minutos. Depois de corado, o excesso de solução é removida utilizando uma solução descorante (7,5% v/v ácido acético, 45% metanol) até ser possível visualizar as bandas de proteína existentes no gel.

3.8.2. MÉTODO DO ÁCIDO BICINCONÍNICO - BCA

O método do ácido bicinconínico foi efectuado de acordo com o protocolo descrito pela Sigma-Aldrich⁷⁴. A 50 partes da solução A (ácido bicinconínico, *Sigma*) foi adicionada 1 parte da solução B (Sulfato de Cobre (II), 4%, *Sigma*). O volume determinado é dividido em alíquotas de 1mL: 7 alíquotas para efectuar a recta de calibração em que são adicionados volumes entre 0 e 24µL da solução de BSA 1mg/mL; o número de alíquotas necessárias com diferentes volumes da amostra a analisar, em duplicado.

As alíquotas reagiram durante 30 minutos a 60°C. Após incubação, foi lida a absorvância de cada amostra a 562nm, utilizando uma célula de quartzo. Através dos valores obtidos foi

possível efectuar a recta de calibração para posterior cálculo dos valores de concentração da proteína em estudo (Ver anexo 2).

3.9. ENSAIOS DE WESTERN BLOT

O ensaio de Western Blot apenas foi utilizado para o sistema proteína *PfHRP*II – anticorpo anti-*PfHRP*II. As culturas foram cultivadas com 5% de hematócrito a 37°C, 5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% de N₂, na Unidade da Malária no Instituto de Medina Molecular. É com os sobrenadantes de duas culturas que contém 0,7 e 1,7% de parasitemia que se realizam as experiências.

Inicialmente as proteínas presentes nas amostras são separadas através de um SDS-PAGE com um gel de 10%. De seguida, as proteínas presentes no gel foram transferidas para as membranas de nitrocelulose iBlot® *Gel Transfer Stacks Nitrocelulose* através do sistema iBlot® *Gel Transfer Device* (Novex by lifetechnology), como demonstrado na Figura 3. 5, que permite transferir as proteínas em apenas 7 minutos⁷⁵.

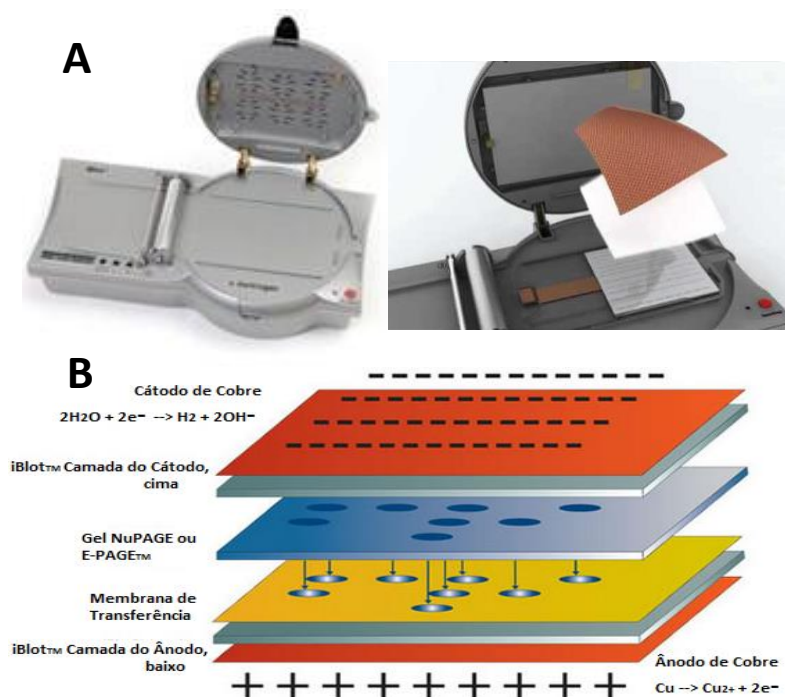


Figura 3. 5 -Western-Blot em Sistema iBlot®. A - iBlot® Gel Transfer Device e; B - iBlot® Gel Transfer Stacks Nitrocelulose. Figura adaptada de⁷⁵

Após o processo de transferência, as membranas de nitrocelulose foram bloqueadas com uma solução de BSA 10mg/mL durante 20 minutos. Depois do bloqueio, uma membrana foi incubada *O.N.* com o anticorpo primário específico para a *PfHRP*II, o anti-*PfHRP*II (comercial 1µg/mL), a outra foi incubada durante 2h com uma solução de Bionanoconjugados (AuNPs-MUA-anti-*PfHRP*II), constituídos por AuNPs de 17nm a 15nm. De seguida, as membranas foram lavadas 3 vezes com o tampão PBST (tampão PBS com 0,05% Tween 20) durante 5 minutos.

No método que utiliza os bionanoconjugados, o procedimento está finalizado e os resultados são visíveis. No método mais comum, que utiliza o sinal de quimioluminescência, após incubação com o anticorpo primário e a lavagem, a membrana é incubada durante 30 minutos

com o anticorpo secundário que está ligado a uma enzima, anti-IgG-HRP (HRP, do inglês Horseradish Peroxidase) diluído 5000 vezes em leite em pó 5%.

Seguidamente, a membrana foi novamente lavada 3 vezes com o tampão PBST (tampão PBS com 0,05% Tween 20) durante 5 minutos. Por último, foi adicionada a solução de substrato de quimioluminescência (*SuperSignalWestPico Chemiluminescent substrate, ECL, Thermo Scientific*) garantindo que cobre toda a membrana, durante 5 minutos. A membrana foi revelada por raio-X utilizando uma hipercassete (*fujifilm*) para autoradiografia e um equipamento AGFA Curix 60.

CAPÍTULO IV: RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PRODUÇÃO, EXPRESSÃO e PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE *Plasmodium falciparum*

Para dar início ao trabalho da elaboração do teste rápido para detecção da malária foi necessário produzir as duas proteínas alvo de estudo: a *PfHsp70* e a *PfHRP11*.

4.1.1. PROTEÍNA *PfHsp70*

A expressão, produção e purificação da proteína no Bionanolab encontra-se otimizada, o que facilita a sua obtenção⁶. Estudos anteriores efectuados no Bionanolab usavam a proteína *PfHsp70*, pelo que esta estava disponível uma quantidade suficiente para utilização neste trabalho, não sendo necessário proceder a uma nova produção.

Foram efectuados testes de pureza da proteína, com recurso a uma electroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE) de forma a certificar que esta estava em boas condições para ser usada nos estudos posteriores. Foi também efectuada uma nova determinação de concentração da proteína pelo método de BCA.

Analizando o gel SDS-PAGE 10% que foi efectuado e apresentado na Figura 4. 1, podemos observar a proteína *PfHsp70*. Esta, apesar de não estar pura, encontra-se com um peso molecular esperado, que é aproximadamente de 70kDa³². A banda situada a cerca de 45kDa pode ser proveniente de alguma degradação da proteína por actuação de proteases, que a divide nos seus diferentes domínios, sendo o maior deles é o domínio N-terminal com 45kDa³². As restantes bandas podem ser provenientes de outras proteínas contaminantes, que são expressas intrinsecamente pela bactéria *E.coli*, na qual se realizou a sobreexpressão da *PfHsp70*.

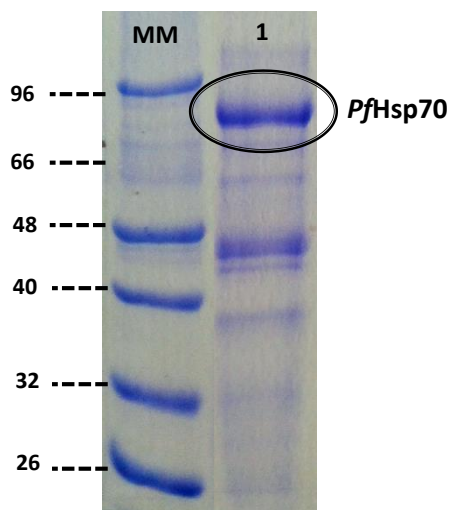


Figura 4. 1 – Gel SDS-PAGE (10%, 150V, 50min). MM – Marcador de Pesos Moleculares (kDa); 1 – Proteína *PfHsp70*

Apesar da proteína *PfHsp70* não estar completamente pura, não se justificou uma nova purificação uma vez que o grau de pureza observado é suficiente para reconhecimento imunológico. Ou seja, como nos ensaios imunocromatográficos são utilizados anticorpos que ligam especificamente ao antígeno, é suficiente para o estudo garantir que na solução está presente a proteína alvo.

Ao determinar a concentração da proteína pelo método de BCA, verificou-se que a proteína *PfHsp70* se apresenta em solução com uma concentração de cerca de 1,6mg/mL, como é ilustrado na Tabela 4. 1 (A recta de calibração encontra-se na Figura A 3, no anexo 2).

Tabela 4. 1 – Valores de densidade óptica e concentração obtidos para a amostra de proteína *PfHsp70* .

	Volume (μ L)	OD (562nm)	Concentração (mg/mL)
<i>PfHsp70</i>	5	0,1756	1,40
	5	0,1578	1,11
	10	0,3396	2,02
	10	0,3167	1,84
MÉDIA			1,6mg/mL

4.1.2. PROTEÍNA *PfHRPII*

A proteína *PfHRPII* é a mais comum para utilização nos RDTs da malária, devido à sua presença significativa no plasma aquando da infecção. Após os testes preliminares efectuados com a proteína *PfHsp70*, a introdução dos testes com a *PfHRPII* foi essencial para prosseguir com o estudo.

O processo de produção da proteína *PfHRPII* está optimizado, embora o processo de purificação ainda se encontre em optimização. Ainda assim, a produção foi elaborada conforme descrito anteriormente no ponto 3.1.2 do Capítulo III. Os 37°C estabelecidos para o crescimento bacteriano são a temperatura óptima para que a *E. coli* se multiplique exponencialmente. A densidade óptica do crescimento bacteriano foi monitorizada de forma a garantir que as nossas células eram viáveis e se encontravam em fase exponencial, para que pudessem ser induzidas.

O trabalho prosseguiu com os 20,63g de sedimento de células obtidos por centrifugação de 6L de meio de cultura. A adição da DNase no tampão que ressuspendeu o sedimento foi essencial para o processo da lise celular, uma vez que ajuda na digestão da parede celular. Além disso, esta enzima digere o DNA genómico tornando a amostra menos viscosa, facilitando a sua passagem na *French Press*. Este método de lise celular utiliza elevadas pressões com o intuito de romper as membranas das células. A centrifugação efectuada posteriormente permite separar todos os resíduos solúveis dos insolúveis. Mais especificamente permite obter todas as proteínas solúveis que foram produzidas pela bactéria, que se encontram no sobrenadante.

De forma a obter a proteína de interesse, foi utilizada uma resina de níquel-NTA uma vez que no vector de expressão da *PfHRPII* tinha sido inserida uma cauda de 6 Histidinas, as quais têm elevada afinidade com o metal níquel. Desta forma, quando a solução rica em várias proteínas passasse através da resina, a proteína alvo ficaria agarrada à mesma, enquanto as outras eram eluídas. O uso de uma solução com concentração elevada de imidazole vai permitir eluir a proteína alvo da resina, devido ao facto desta competir com a cauda de histidinas na ligação ao metal⁷⁶.

Após a produção e purificação da proteína *PfHRPII*, esta foi analisada através de um gel SDS 10% que se apresenta na Figura 4. 2, sendo a sua concentração estimada pelo método de BCA.

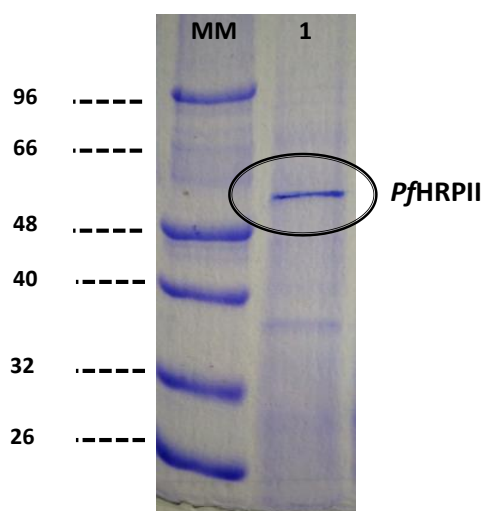


Figura 4. 2 - Gel SDS-PAGE (10%, 150V, 50min). MM – Marcador de Pesos Moleculares (kDa); 1 – Proteína *PfHRP II*

No gel SDS-PAGE da Figura 4. 2 podemos observar 2 bandas nítidas, uma das quais cerca dos 50kDa, pertence à proteína alvo, *PfHRP II*. A outra banda apresenta-se a cerca dos 37kDa e pode ser derivada da presença da proteína *PfHRP III* em solução⁶⁸. Apesar de a amostra conter uma pequena contaminação, a solução contém maioritariamente a proteína alvo como era pretendido. A contaminação não irá influenciar os estudos da deteção uma vez que será utilizado o anticorpo específico para a proteína *PfHRP II*.

Segundo o método BCA, a concentração estimada da proteína *PfHRP II* produzida foi de 0,78mg/mL, como representado na Tabela 4. 2 (A recta de calibração encontra-se na Figura A 4, no anexo 2). A quantidade total obtida nesta produção foi de 3,12mg partindo dos 6L iniciais. Como podemos constatar, a eficiência da produção, expressão e purificação da *PfHRP II* é relativamente baixa, pelo que todo este processo necessitará de ser optimizado em trabalhos futuros.

Tabela 4. 2 - Valores de densidade óptica e concentração obtidos para a amostra de proteína *PfHRP II*.

	Volume (μL)	OD (562nm)	Concentração (mg/mL)
<i>PfHRP II</i>	5	0,1609	0,79
	5	0,1622	0,83
	10	0,2205	0,73
	10	0,2248	0,77
MÉDIA			0,78 mg/mL

4.2. PRODUÇÃO e PURIFICAÇÃO DE ANTICORPOS MONOCLONAIS

Para que fosse possível ocorrer o reconhecimento específico dos antígenos alvo, foi necessário produzir e purificar os respectivos anticorpos monoclonais. O antígeno *PfHsp70* é reconhecido pelo anticorpo anti-*PfHsp70*, 2E6, produzido na Unidade da Malária, no Instituto de Medicina Molecular, e purificado no Bionanolab, e o antígeno *PfHRP II* que é reconhecido pelo anticorpo anti-*PfHRP II*, obtido comercialmente em *antibodies-online.com*.

Concluído o processo de purificação do anticorpo anti-*Pf*Hsp70, a sua pureza foi avaliada através da visualização da amostra num gel SDS 12%, que se apresenta na Figura 4. 3.

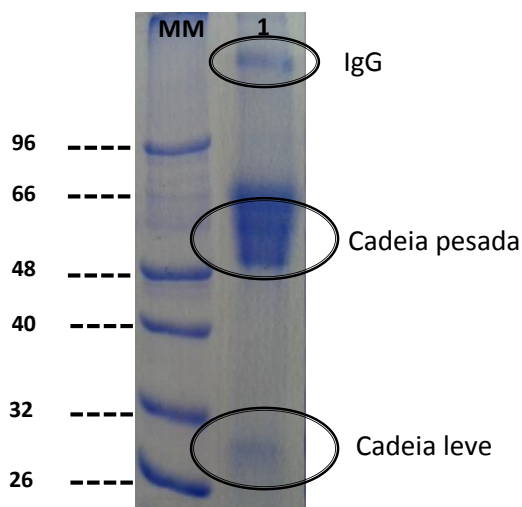


Figura 4. 3 - Gel SDS-PAGE (12%, 150V, 50min). MM – Marcador de Pesos Moleculares (kDa); 1 – Anticorpo anti-*Pf*Hsp70, 2E6

O gel apresentado pela amostra de anticorpo anti-*Pf*Hsp70 apresenta duas bandas situadas cerca de 50kDa e 25kDa que correspondem à cadeia pesada e à cadeia leve das IgG, respectivamente. Com um peso molecular de cerca 150kDa, apresenta-se uma banda que corresponde à molécula de IgG, possivelmente devido ao facto de as pontes de dissulfureto não terem sido completamente quebradas pelo agente redutor (β -mercaptoetanol) mantendo as duas cadeias juntas. Para ultrapassar este problema pode-se aumentar o tempo de aquecimento da amostra ou aumentar as percentagens do agente redutor.

Para determinar a concentração do anticorpo foi feito um ensaio de BCA onde se obteve um valor estimado de 1,5mg/mL.

No que respeita o anticorpo anti-*Pf*HRPII, este foi obtido comercialmente mas, ainda assim, confirmou-se através de um gel SDS 12% o seu grau de pureza. O gel obtido é apresentado na Figura 4. 4.

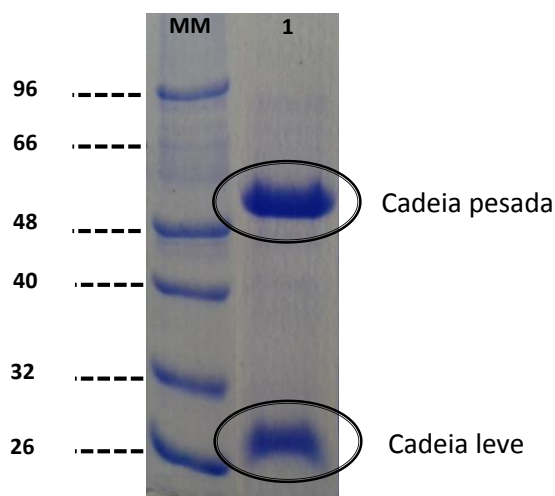


Figura 4. 4 - Gel SDS-PAGE (12%, 150V, 50min). MM – Marcador de Pesos Moleculares (kDa); 1 – Anticorpo anti-*Pf*HRPII

O resultado do gel obtido correspondeu ao esperado uma vez que apresenta 2 bandas correspondentes às duas cadeias presentes nos anticorpos IgG. A cerca de 50kDa encontra-se a banda correspondente à cadeia pesada e, com cerca de 25kDa, a da cadeia leve do anticorpo. Estas duas cadeias são separadas pela quebra das pontes de dissulfureto pelo agente redutor, como anteriormente mencionado. Foi portanto confirmado que o anticorpo anti-*Pf*HRPII estava em boas condições de utilização. A concentração *stock* do anti-*Pf*HRPII é de 6mg/mL.

4.3. SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO (AuNPs)

O processo de síntese de nanopartículas de ouro pelo método de Turkevich⁵⁴ engloba 4 etapas que são acompanhadas pelas diferentes cores. Este método foi desenvolvido por Kimling⁵³ é bastante reprodutível, uma vez que em todas as sínteses o espectro de UV-Vis obtido foi idêntico, revelando um diâmetro das AuNPs e concentrações muito semelhantes. Como patente na Figura 3. 2 (Capítulo III, imagem 1) a solução de sal de ouro apresenta cor amarela, proveniente dos complexos de ouro. Ao ser adicionado o agente redutor citrato, este rapidamente reduz todo o sal de ouro presente na solução como resposta à sua oxidação, apresentando-se incolor por breves segundos. Neste ponto, os núcleos de sal de ouro dissociam-se e os pequenos núcleos de ouro originados são rapidamente revestidos e estabilizados pelo citrato de sódio, uma vez que este se encontra em excesso. Com um tamanho muito reduzido, os núcleos revestidos apresentam uma cor muito escura, quase preta como podemos observar na imagem 3 da Figura 3. 2, do capítulo III. À medida que vão crescendo, a LSPR vai-se deslocando para comprimentos de onda maiores, até estabilizarem a cerca de 15nm, apresentando uma cor avermelhada. Na Figura 4. 5 é apresentado o espectro de UV-Vis obtido para uma síntese de nanopartículas de ouro segundo o método descrito.

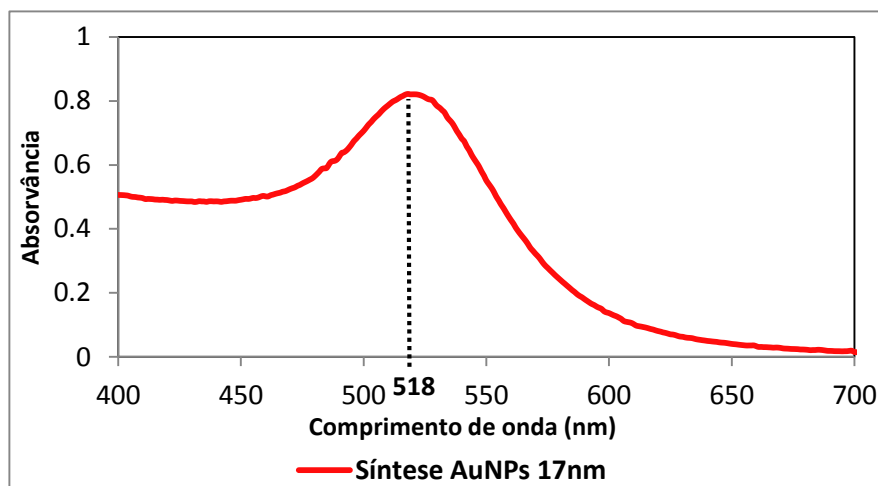


Figura 4. 5 – Espectro UV-Vis da síntese de AuNPs com 17nm. Espectro com absorvância da LSPR máxima a 518nm com uma razão de agregação de 0,167. A concentração de AuNPs nesta solução é de 1nM.

De forma a poder avaliar o estado de agregação das AuNPs, calcula-se o rácio entre a absorvância do estado agregado, com banda característica a 600nm, e a absorvância da LSPR apresentada pela solução de AuNPs em estado coloide, que neste caso ocorre a 518nm. Quanto maior o valor deste rácio, maior o número de AuNPs agregadas. Considerou-se que para um valor de rácio de 0,7 a solução já se encontra num estado agregado, uma vez que corresponde ao ponto

de variação de cor apresentada, passando de vermelho (estado colóide) para azul (estado agregado). Nesta síntese, a razão de agregação foi 0,167, indicando que a solução não se encontra agregada mas sim em boas condições de utilização. Contudo, este valor de agregação aparenta ser um bom indicador em como existem algumas diferenças, embora pouco significativas, no estado de monodispersão das partículas produzidas durante a síntese. A monodispersão pode também ser avaliada pela largura da banda apresentada no espectro UV-Vis das AuNPs: quanto maior a largura, maior é a variação de tamanhos das partículas na solução. Estas diferenças podem ser confirmadas com técnicas apropriadas para caracterização com elevada resolução como a Microscopia de Transmissão Electrónica (TEM, *Transmission Electron Microscopy*).

Para calcular o tamanho e a concentração das AuNPs em solução, foi seguido o método de Haiss *et al.*⁷³ onde o primeiro passo é determinar o diâmetro das AuNPs. Para isso, foi necessário calcular o rácio entre a absorvância da LSPR máxima e absorvância registada a 450nm, como apresentado na Equação 4. 1.

$$y = \frac{A_{SPR(518nm)}}{A_{450nm}} = \frac{0,822}{0,491} = 1,673 \quad (I)$$

Substituindo este valor na equação da recta $y = 0,3335x + 0,7301$:

$$x = 2,83. \text{ Fazendo } e^x = e^{2,83} = 17 \quad (II)(III)$$

Equação 4. 1 – Equação segundo Haiss *et al.*⁷³ para calcular o diâmetro das partículas. (I) rácio entre a absorvância na SPR máxima e a absorvância a 450nm, (II) extrapolação do valor de x da recta de calibração do método e (III) exponencial do valor obtido em (II), que indica o valor do diâmetro médio das nanopartículas de ouro.

O valor de 17 corresponde assim ao diâmetro de cada nanopartícula de ouro (em média), em nanómetros. A partir deste valor é então possível calcular a concentração, uma vez que a cada valor de diâmetro corresponde um valor de ϵ_{450nm} tabelado⁷³. Seguidamente, calcula-se a concentração (a partir da Equação 3. 1, do Capítulo III) tendo em conta o factor de diluição. A concentração final obtida nesta síntese de AuNPs foi de 4,54nM.

Com o intuito de melhorar o RDT em estudo, foram utilizadas nanopartículas de ouro de maior diâmetro. Desta forma, teoricamente, aumentando a superfície de reacção das AuNPs cerca de 8 vezes (ver cálculos no anexo 3), será possível aumentar a sua sensibilidade, uma vez que terá maior razão de anticorpo à superfície. As nanopartículas utilizadas para este estudo foram, como já mencionado, fornecidas pelo Mestre Miguel Peixoto do grupo da Prof. Eulália Pereira, REQUIMTE, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, nossos colaboradores. Estas AuNPs foram previamente analisadas por TEM, pelo Mestre Pedro Quaresma, para se determinar o seu tamanho bem como para analisar a uniformidade das partículas esféricas, como se pode observar na Figura 4. 6, fornecida amavelmente pelo mesmo.

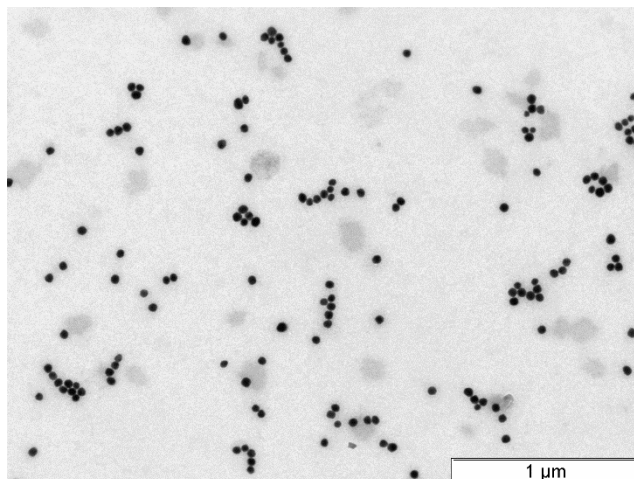


Figura 4. 6 – Micrografia de TEM da solução coloidal de AuNPs 48nm.

As AuNPs de maior tamanho apresentaram por TEM cerca de 48nm de diâmetro e uma concentração de 0,095nM. No Bionanolab, foi traçado um espectro, ilustrado na Figura 4. 7, para se verificar o estado de agregação da solução e se confirmar e comparar o tamanho e respectiva concentração obtido pelo método descrito por *Haiss et al.*⁷³.

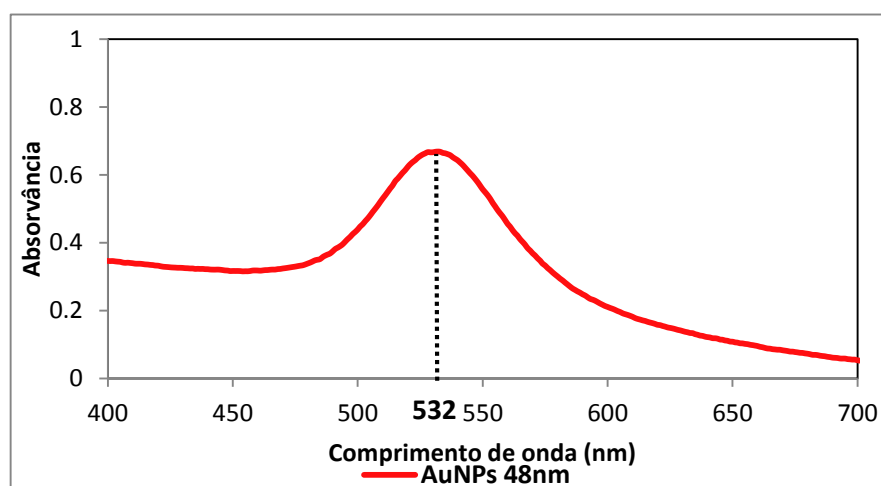


Figura 4. 7 - Espectro UV-Vis das AuNPs com 48nm. Espectro com absorvância da LSPR máxima a 532nm com uma razão de agregação de 0,26. A concentração de AuNPs nesta solução é de 0,05nM.

Como expectável, estas partículas maiores, de 48nm, apresentam uma LSPR situada nos 532nm que é superior à apresentada pelas partículas de 17nm (LSPR a 518nm) uma vez que apresentam um diâmetro maior. Com o aumento do diâmetro das AuNPs há uma diminuição da frequência de movimento dos plasmões, resultando no aumento do comprimento de onda da banda LSPR, uma vez que são inversamente proporcionais. Por isto, as NP maiores apresentam uma LSPR a comprimentos de onda maiores.

A razão de agregação que a solução de AuNPs de 48nm apresenta é de 0,26. Este valor é devido ao facto de, por serem partículas maiores e mais pesadas, terem maior tendência para se ir juntado ao longo do tempo, formando pequenos aglomerados, sem agregação, como se pode confirmar pela Figura 4. 6. Pelo método adoptado (*Haiss et al.*⁷³) e através do espectro obtido, calculou-se que esta solução de nanopartículas de ouro apresenta com 51nm de diâmetro a uma concentração de 0,11nM. Apesar de se confirmar que as partículas se encontram em boas condições, podemos analisar que os dados obtidos são ligeiramente diferentes dos registados por

TEM. Esta microscopia é bastante sensível no que diz respeito ao controlo do tamanho das nanopartículas uma vez que a imagem é gerada a partir da interacção dos electrões, que são transmitidos por um feixe ultra-fino, com a amostra. O TEM permite a medição de partículas individuais, enquanto a espectroscopia faz uma média de todas as partículas em solução. Sendo a resolução melhor, foi considerado que 48nm era o tamanho correcto das AuNPs mas, a concentração que foi considerada foi a calculada pelo método de *Haiss et al.*⁷³, 0,11nM.

A maior dispersão de luz reflecte-se no aumento do valor de ϵ associado. Logo, para atingir o mesmo valor de absorvância, são necessárias concentrações inferiores de AuNPs de 48nm, como podemos observar na Figura 4. 8. O facto de, para a mesma absorvância, as AuNPs de 48nm poderem estar cerca de 20 vezes mais diluídas, comparativamente com as AuNPs de 17nm, poderá ser uma enorme vantagem na medida em que se pode usar bastante menor quantidade, aquando da realização dos RDTs.

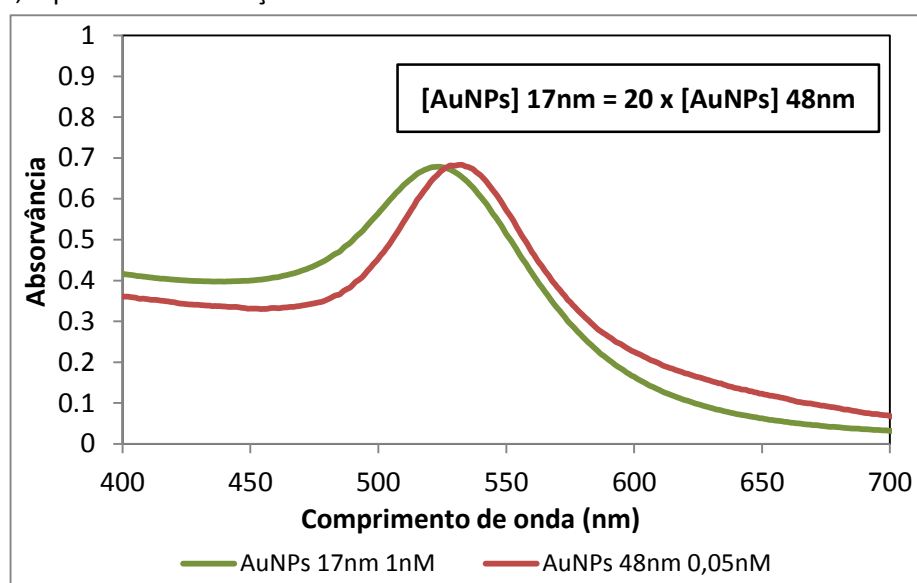


Figura 4. 8 – Espectro UV-Vis normalizado para a absorvância para comparação das intensidades das bandas LSPR das nanopartículas de ouro de 17nm e de 48nm.

A síntese efectuada fornece às nanopartículas de ouro um revestimento com citrato de sódio que pode ser modificado, usando para tal uma molécula que contenha um grupo químico que tenha maior afinidade para o ouro que a ligação electrostática que existe entre os grupos terminais do citrato com o ouro. Neste trabalho foi utilizado o MUA, que possui enxofre numa das extremidades, permitindo efectuar uma ligação covalente com o ouro. Por outro lado, sendo o MUA uma molécula bifuncional, também favorece a ligação electrostática do anticorpo à superfície da nanopartícula de ouro⁴⁸.

4.4. FUNCIONALIZAÇÃO COM MUA

As razões molares de funcionalização com MUA em relação às AuNPs de 17nm já tinham sido estudadas anteriormente no laboratório, sendo que a razão utilizada de AuNPs 17nm:MUA foi de 1:5.000⁷⁷.

Com o intuito de estudar qual seria a razão necessária de MUA para cobrir toda a superfície esférica das nanopartículas de ouro de 48nm, prepararam-se várias soluções com diferentes

quantidades de MUA. Foram feitas razões de AuNPs:MUA entre 1:20.000 e 1:90.000. Após incubação cerca de 1h, as nanopartículas funcionalizadas são centrifugadas durante 10 minutos de forma a eliminar o MUA que não ficou adsorvido à superfície das AuNPs. Cada solução com diferente razão de MUA foi estudada numa gama de valores de pH de 2 a 6, de forma a verificar o estado de agregação de cada uma das soluções face ao valor de pH ajustado. O resultado do estudo apresenta-se na Figura 4. 9-A e é representado pela razão de agregação vs pH, sendo considerado que acima de 0,7 ocorre agregação. O fenómeno de agregação é acompanhado por uma alteração da cor da solução, mostrada na Figura 4. 9-B e C (razão 30.000 e 40.000 de MUA)

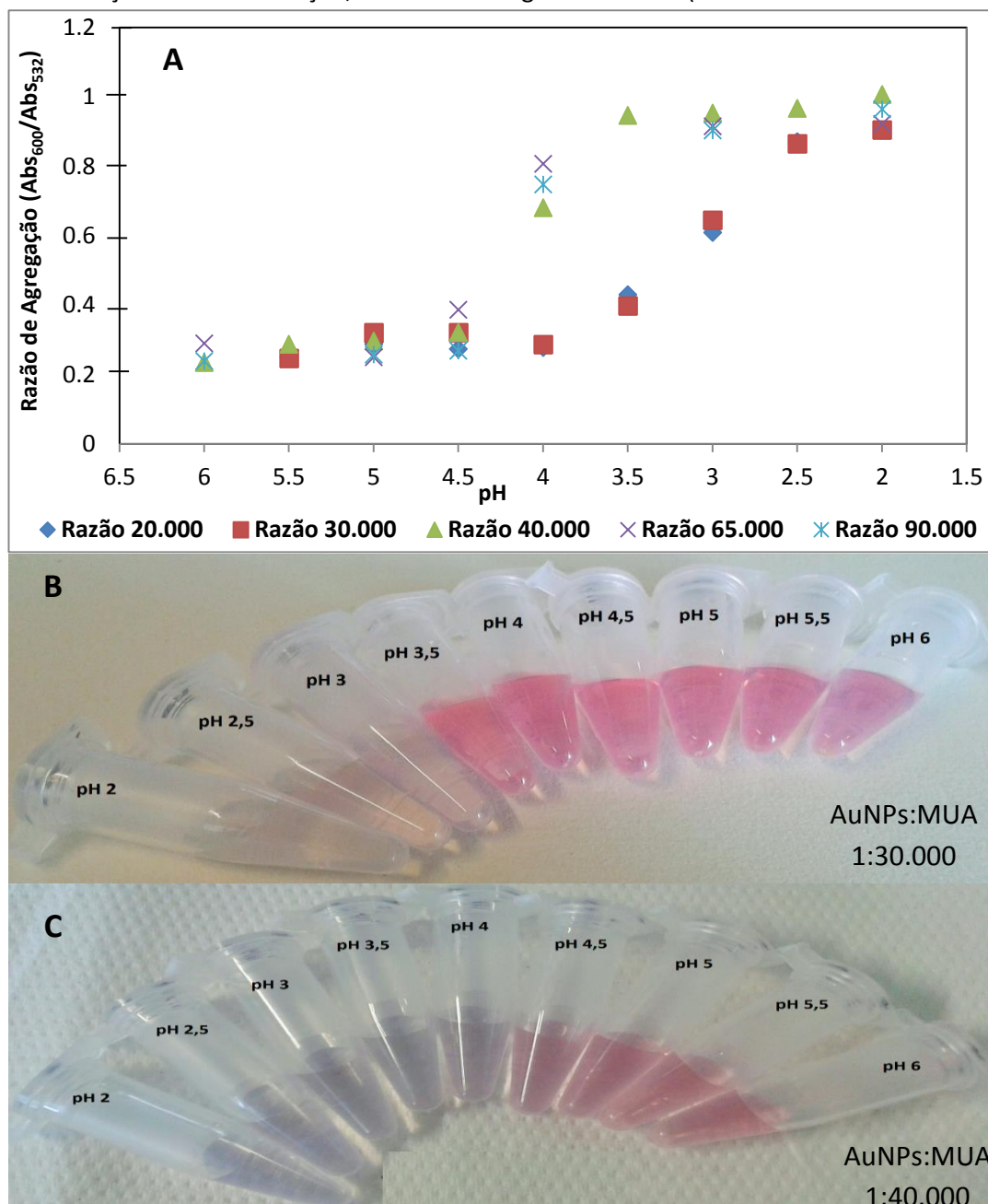


Figura 4. 9 – (A) Razão de Agregação das soluções de AuNPs 48nm com diferentes razões molares de MUA em função do valor de pH. A Razão de Agregação é calculada através do rácio entre a absorvância da forma agregada, aos 600nm, e a absorvância na forma não agregada, na banda de SPR, neste caso 532nm. Alteração de cor das soluções de AuNPs:MUA 1:30.000 (B) e 1:40.000 (C) com diferentes valores de pH.

O principal objectivo da utilização de diferentes valores de pH para estudar qual a razão necessária de MUA para revestir as AuNPs maiores, relaciona-se com o facto de este nos permitir

obter informação acerca do seu revestimento. As partículas têm no seu revestimento moléculas carregadas que criam forças repulsivas que as mantêm afastadas. Quando o pH do meio iguala o pK_a dessas moléculas, estas passam a ter carga nula, permitindo que haja agregação.

Como também se pode observar na Figura 4. 9-A, as razões molares de 20.000 e 30.000 de MUA para as AuNPs não são ainda suficientes para revestir toda a partícula uma vez que a agregação ocorre a um valor de pH cerca de 3. Este valor de pH é bastante próximo do valor de pK_a do citrato de sódio, que é de 3.13⁷⁸, indicando que o revestimento inicial das AuNPs ainda não foi completamente substituído por MUA. Na Figura 4. 9-B podemos observar e confirmar a alteração de cor das soluções de AuNPs-Citrato com diferentes valores de pH, associado ao fenómeno de agregação. A solução de AuNPs-Citrato mantém-se vermelha até ao valor de pH 3 (valor aproximado do pI do citrato de sódio) e, a partir daí para pHs mais ácidos, a solução agrega, apresentando-se azul. A partir da razão de 40.000, inclusivé, a quantidade de MUA já é suficiente para cobrir toda a superfície da nanopartícula uma vez que a agregação é atingida entre o valor de pH 4 e 4,5, em que este último está muito próximo do valor de pK_a apresentado pelo MUA⁷⁹. Na Figura 4. 9-C pode-se confirmar o comportamento observado no gráfico, onde, até ao pH 4,5, a solução se apresenta no seu estado coloidal, apresentando-se com a sua cor característica vermelha. A partir do pH 4, a solução começa a ficar cada vez mais azulada, característico de estado agregado. Pelos resultados obtidos verificou-se que a razão de MUA para as AuNPs de 48nm considerada adequada e que foi usada no presente trabalho é de 1:40.000 pois já ocorre agregação ao pK_a do MUA. Para as razões molares maiores de MUA para as AuNPs, o comportamento é semelhante ao da razão de 40.000, pelo que não se justifica a utilização de razões tão elevadas. Teoricamente, a área superficial apresentada pelas AuNPs esféricas de 48nm de diâmetro é 8 vezes superior à apresentada pelas 17nm. Tal facto é coerente com ser utilizada uma razão molar de 5.000 de MUA para as AuNPs de 17nm enquanto para as AuNPs de 48nm é usada uma razão de 40.000, que é também 8 vezes superior.

Para confirmar a presença do MUA como camada à superfície da AuNP, basta comparar os valores obtidos na absorvância de um espectro de UV-Vis de AuNPs-Citrato com o de AuNPs-MUA, que diferem apenas em 2/3nm na LSPR, onde para as AuNPs-MUA correspondem os comprimentos de onda maiores. Na Figura 4. 10 podemos observar esse pequeno desvio na LSPR entre os dois revestimentos.

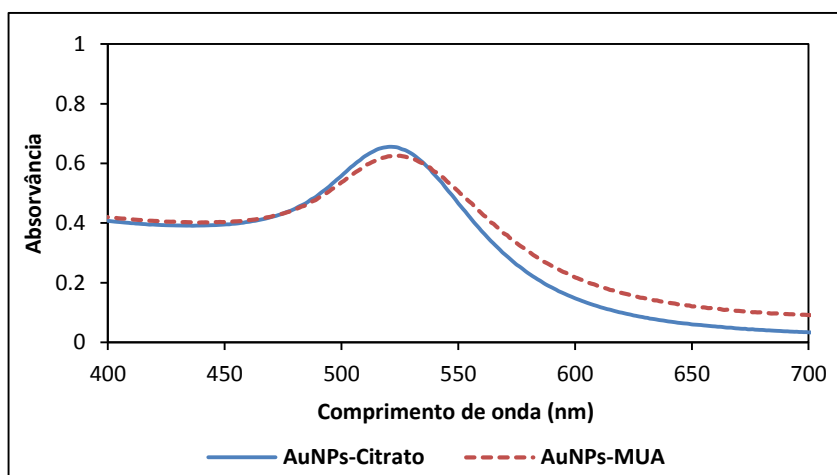


Figura 4. 10 – Espectro da solução de AuNPs-Citrato e de AuNPs-MUA para observar o desvio na LSPR quando é alterado o revestimento.

4.5. FORMAÇÃO DE BIONANOCONJUGADOS

Para as nanopartículas de 17nm a razão molar utilizada de anticorpo (*Pf*Hsp70 ou *Pf*HRP II) para as AuNPs na formação de um bionanoconjugado revestido e apto para um reconhecimento sensível era já conhecida e de 1:25. Esta razão foi determinada a partir de estudos de potencial zeta, DLS e electroforese em géis de agarose, anteriormente efectuados no Bionanolab. Para as AuNPs de 48nm a razão necessária de anticorpo é alvo de estudo na presente dissertação.

Para tal, foram preparadas soluções com razões molares do anticorpo 2E6 (anti-*Pf*Hsp70) para as AuNPs entre 0 e 125. Testaram-se as propriedades de agregação para cada solução, numa gama de concentrações do sal cloreto de sódio (NaCl), entre 0 e 2,5M, Figura 4. 11. Os iões Na^+ e Cl^- irão destabilizar as cargas à superfície da AuNP por competição com as moléculas de água. Com o aumento da concentração de sal, as partículas deixam de estar solvatadas e ficam sujeitas à acção do ião positivo no cancelamento das cargas negativas da superfície. Além disso, a presença de elevadas concentrações de sal conduz a uma alteração do campo eléctrico em solução, minimizando todas as forças repulsivas existentes entre partículas, promovendo a sua agregação⁴⁸. Quando o NaCl é capaz de interagir com as cargas superficiais das AuNPs, significa que estas estão expostas, devido ao facto do anticorpo não estar ligado em todos os locais de ligação disponíveis. Portanto, a quantidade de sal necessária para que ocorra agregação dos bionanoconjugados é directamente proporcional ao grau de revestimento das AuNPs com anticorpos.

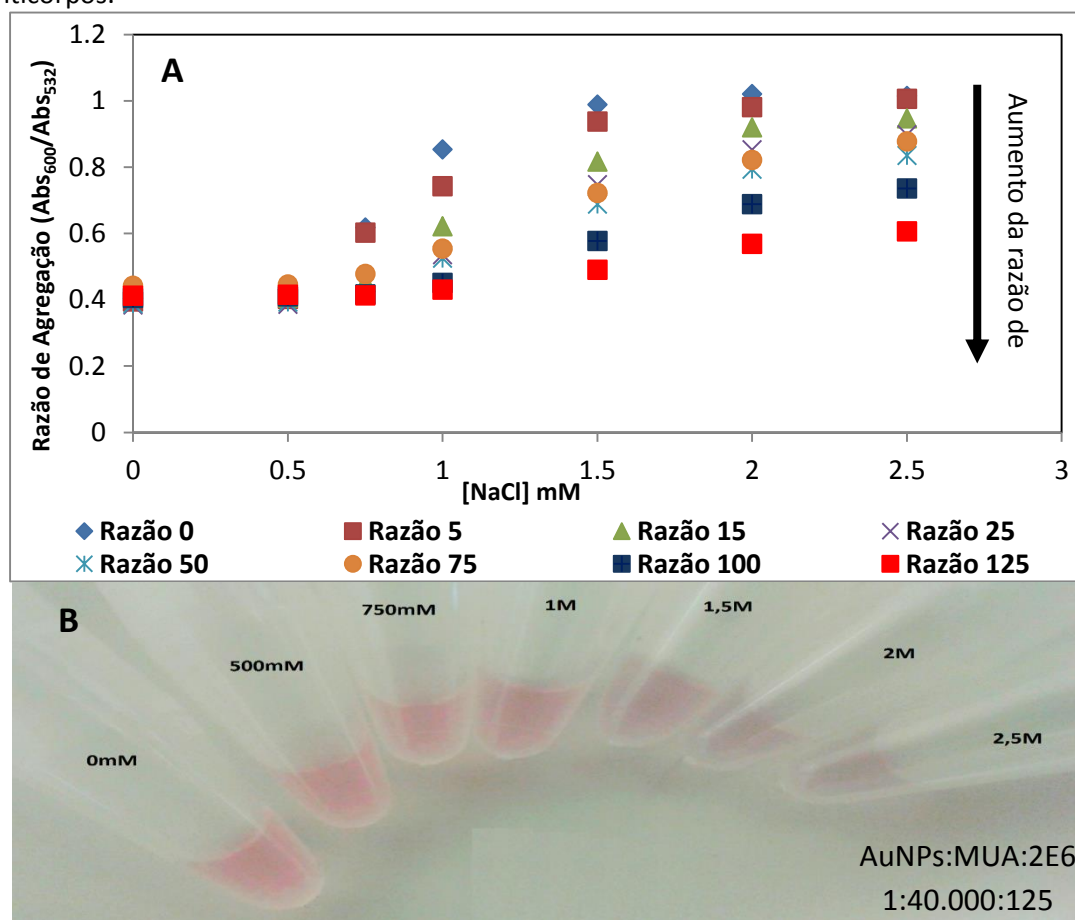
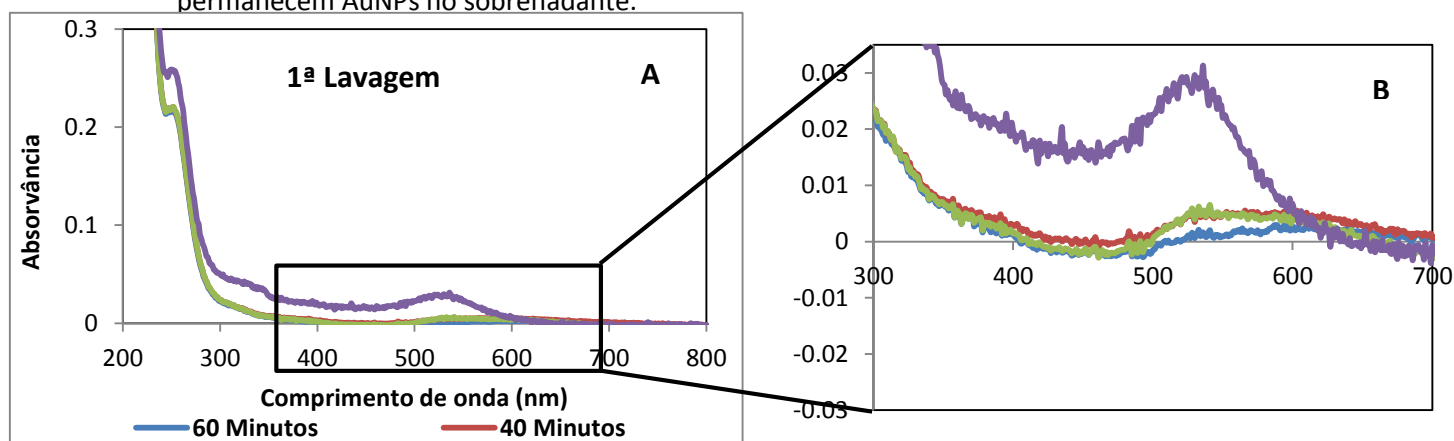


Figura 4. 11 – (A) Razão de Agregação dos bionanoconjugados de AuNPs de 48nm preparados com diferentes razões molares de 2E6 (anti-*Pf*Hsp70) em função da concentração de NaCl. A razão de agregação é calculada através do rácio entre a absorvância da forma agregada, aos 600nm, e a absorvância da forma não agregada, na banda de LSPR, neste caso 532nm. **(B)** Alteração de cor das soluções de AuNPs:MUA:2E6 1:40.000:125 com diferentes concentrações de NaCl.

Como podemos observar, da razão 0 até à razão molar de 75, o comportamento dos BNCs é idêntico, onde à medida que se aumenta a força iónica maior é a agregação, no entanto esta agregação é cada vez menor à medida que se aumenta a quantidade de anticorpo (Figura 4. 11-A). Apesar de na razão molar de 100 já ser observado o comportamento desejado, onde a diferença de agregação já é baixa, a razão de 125 é a considerada correcta e utilizada em trabalhos futuros uma vez que a diferença na razão de agregação dos 0M para os 2,5M de sal foi apenas cerca de 0,1. Na Figura 4. 11-B podem ser confirmadas, através da cor, as razões de agregação apresentadas para a razão molar de 125 de anticorpo. Estas, como podemos observar, estão no seu estado colóide, caracterizada pela cor vermelha, mesmo para concentrações elevadas de NaCl. Apesar de na razão 2,5M de sal a solução já não estar no seu estado colóide total, esta ainda apresenta uma ligeira cor vermelha, associada a uma razão de agregação de cerca de 0,6, que não corresponde ao estado agregado. O facto da estabilidade das AuNPs não ser afectada com o aumento da força iónica deve-se ao facto da sua superfície já estar completamente revestida com o anticorpo 2E6, criando-se mais impedimentos estéricos que impedem a agregação dos BNCs. Encontradas as razões molares de anticorpo para revestir as AuNPs de 17 e 48nm de diâmetro e preparação dos respectivos BNCs, foi então possível prosseguir com o trabalho.

Na formação dos BNCs, além dos tempos de incubação com o MUA e anticorpo, são necessários vários passos de lavagens com diferentes tempos (ver ponto 3.5 do capítulo III). Estes passos de lavagens são cruciais na medida que concentram os BNCs e removem excessos de ligandos. Como a elaboração dos bionanoconjugados é um passo crucial ao longo do trabalho, era importante certificar que os preparávamos no menor tempo possível. Sabemos que este processo tem início após a incubação das AuNPs com MUA durante 1h, e durante a noite com o anticorpo específico. Inicialmente, após a última incubação, havia uma lavagem durante 60 minutos, seguido de uma incubação de 1h com a proteína BSA. De seguida, a solução era lavada durante mais 60 minutos e, por fim, depois de ressuspensionado o sobrenadante, era efectuada uma última lavagem de 30 minutos. O total do tempo do procedimento era de 3h30min. Uma vez que este tempo é elevado pretende-se testar diferentes tempos de lavagem com o intuito de diminuir o tempo do procedimento.

Todas as ligações entre superfícies inorgânicas com os grupos terminais electrodoadores, provenientes das moléculas dos ligandos, como tióis ou aminas, formam um sistema dinâmico, que está em equilíbrio. Este equilíbrio gera uma consequência importante que é o facto de as moléculas se poderem desligar por lavagem excessiva ou por acção de massa proveniente de outro ligando. Esta consequência pode comprometer a estabilidade das AuNPs, podendo dar origem a agregações ou precipitações⁴⁸. Desta forma, foi feito um estudo com o intuito de diminuir estes tempos de lavagem (Figura 4. 12), garantindo que com tempos curtos não permanecem AuNPs no sobrenadante.



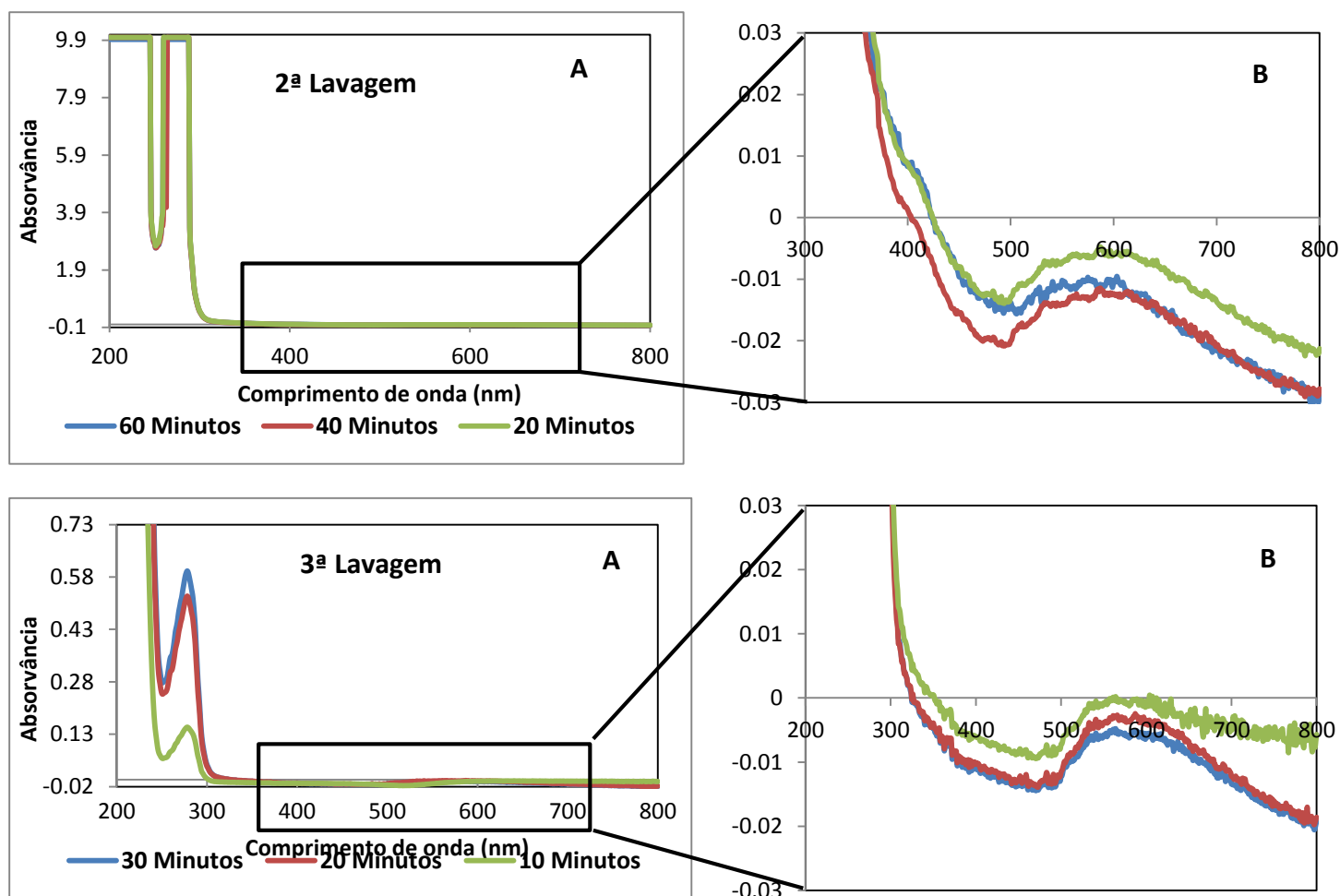


Figura 4. 12 – Espectros UV-Vis dos sobrenadantes obtidos a partir dos diferentes tempos de lavagem na formação dos bionanoconjugados. Os espectros (B) são ampliações dos espectros (A) correspondentes a cada lavagem.

Analisando os espectros da Figura 4. 12, na 1ª lavagem podemos concluir que 20 minutos são suficientes para a lavagem dos BNCs uma vez que, comparando com 60 e 40 minutos, o espectro obtido é muito semelhante, indicando que está a haver uma boa separação, entre as AuNPs e solução tampão que as envolve, com menor tempo de centrifugação. Observando o espectro obtido com apenas 10 minutos de lavagem, verificamos que aparece uma banda a cerca dos 520nm, que corresponde a vestígios de bionanoconjugados. Apesar de não ser muito significativo, aos 10 minutos ainda há alguma perda da amostra pelo que 20 minutos foi o tempo adoptado. Na 2ª lavagem, diminuiu-se o tempo inicial para os 20 minutos pela razão de que, comparando os espectros obtidos, estes se apresentam bastante semelhantes, não justificando uma lavagem tão longa. Para o 3º e último passo de lavagem, apesar de o espectro de 10 minutos não se encontrar nas melhores condições, verificou-se que o máximo de absorvância continua abaixo de 0, indicando que não estão presentes bionanoconjugados no sobrenadante, como pretendido.

Desta forma, foi possível diminuir o tempo de preparação dos BNCs para cerca de metade, e apenas será necessário 1h50min, notando que o tempo de incubação com a proteína BSA (1h) não foi alterado.

Por fim, de forma a se estudar mais aprofundadamente a composição dos BNCs preparados foi avaliada a quantidade de anticorpo imobilizada na superfície das AuNPs, assim como a quantidade que era libertada em cada passo de lavagem. Este ensaio foi apenas realizado

com as partículas de 17nm e consistiu na quantificação da proteína total nos sobrenadantes resultantes de cada lavagem, através do método de BCA. Como é conhecida a quantidade de anticorpo inicialmente incubada com as AuNPs, foi possível determinar a quantidade libertada e assim calcular a quantidade que fica no BNC. Ao fim da 1ª lavagem, como a única proteína que foi introduzida foi o anticorpo, tudo o que quantificarmos será anticorpo. A quantidade de anticorpo que sai nas 2 últimas lavagens é considerada pouco relevante, uma vez que na 1ª lavagem foi calculada uma quantidade muito pequena de anticorpo no sobrenadante. Uma vez que, por este método de quantificação não permite distinguir as proteínas, foi considerado que nas duas lavagens seguintes tudo o que foi quantificado foi proveniente da proteína BSA, pois esta foi utilizada em grande excesso relativamente à quantidade de anticorpo (12mg de BSA e 51µg de anticorpo). Às AuNPs de 17nm fica imobilizado 95% de todo o anticorpo que é adicionado e 46% da proteína BSA fica a bloquear (A recta de calibração e os valores de OD obtidos estão apresentados na Figura A 5 e Tabela A 2, no anexo 2)

4.6. ESTABILIDADE DAS NANOPARTÍCULAS e DOS BIONANOCONJUGADOS

Após preparação dos BNCs, foi estudada a estabilidade dos 4 diferentes estágios das nanopartículas de ouro: as AuNPs-citrato, provenientes directamente da síntese; as AuNPs-MUA, após mudança de revestimento; e os BNCs sem bloqueio com a proteína BSA, AuNPs-MUA-anti*Pf*Hsp70, e os BNCs com bloqueio com a proteína BSA, AuNPs-MUA-anti*Pf*Hsp70(BSA), usados no RDT. Este bloqueio é feito entre os passos de lavagens, para que a BSA se ligue a todos os locais da superfície das AuNPs que não estão ocupados com o anticorpo. Desta forma impede que os BNCs tenham ligações inespecíficas com outros antígenos ou ligandos. O que se pretende é verificar se este bloqueio é fundamental para conferir a elevada estabilidade dos BNCs para o teste. Além de se pretender analisar a estabilidade das partículas em solução em relação ao seu revestimento, pretende-se também verificar se a estabilidade é alterada com o aumento do diâmetro da nanopartícula. Os testes foram feitos com razões fixas e já conhecidas de MUA e anticorpo para as partículas com os dois tamanhos, 17 e 48nm (1:5.000:25 e 1:40.000:125, respectivamente), numa gama de concentração de NaCl de 0 a 500mM e de pH 2 a 8.

4.6.1. VARIAÇÃO DA FORÇA IÓNICA

A Figura 4. 13 ilustra a variação da estabilidade das AuNPs de 17nm com diferentes tipos de revestimento em solução. Podemos observar que as AuNPs-Citrato apresentam menor estabilidade à medida que é aumentada a força iónica do meio envolvente, uma vez que atingem o ponto de agregação a cerca de 60mM de NaCl e ficam completamente agregadas aos 75mM de sal. A troca do agente de revestimento para o MUA não só favorece a ligação do anticorpo como confere uma maior estabilidade às partículas uma vez que a agregação tem início apenas aos 125mM de sal. Por outro lado, o passo de bloqueio dos bionanoconjugados com BSA é crucial pois, como podemos verificar, apenas este confere uma elevada estabilidade, isto é, não altera o estado de agregação, mesmo quando expostos a elevadas forças iónicas. Este comportamento estável não se observa para os bionanoconjugados sem bloqueio da BSA já que iniciam a agregação aos 200mM de sal.

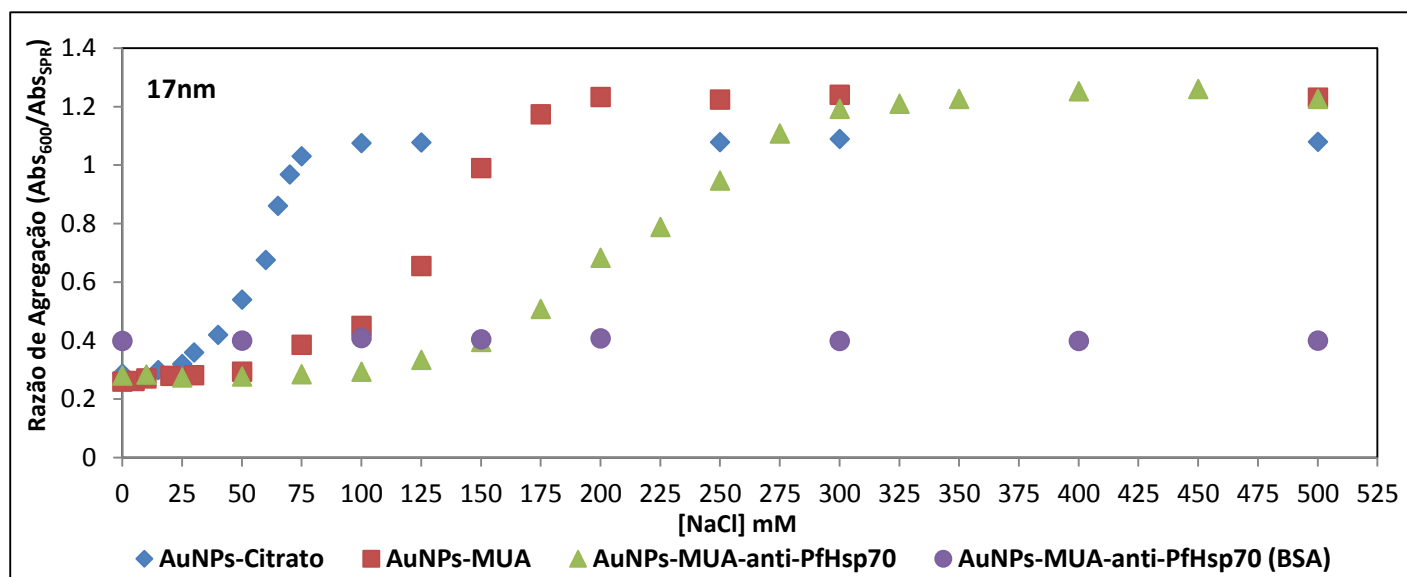


Figura 4.13 – Razão de Agregação das AuNPs de 17nm com AuNPs-citrato, AuNPs-MUA e Bionanoconjugados em função do aumento da concentração de NaCl no meio.

Na ausência de sal, a razão de agregação já se encontra a cerca de 0,25 para todas as partículas testadas, com exceção dos BNCs com BSA em que a razão de agregação é já de 0,4. Tais valores indicam a existência de alguma agregação inicial. Estes valores são no entanto pequenos comparativamente com valores de razão de agregação de 1,2, que se atingiram nestes ensaios. Na Tabela 4. 3 apresentam-se os valores de concentração de sal nos quais foi atingido o ponto início de agregação para cada caso estudado.

Tabela 4. 3 – Valores de concentração de NaCl nos quais foram atingidos os pontos de agregação para as AuNPs de 17nm com diferentes revestimentos

AuNPs 17nm	AuNPs-Citrato	AuNPs-MUA	AuNPs-MUA-anti-PfHsp70	AuNPs-MUA-anti-PfHsp70(BSA)
Ponto de Agregação	60mM	125mM	200mM	Ausência de agregação até 500mM

O facto das AuNPs-MUA-Anticorpo se tornarem mais estáveis deve-se ao facto de estas moléculas conferirem resíduos carregados à superfície, tornando-as mais estáveis do que com apenas com MUA. Quantos mais resíduos existirem, mais difícil será a neutralização das cargas superficiais, e assim a agregação dá-se a concentrações de NaCl superiores. Por outro lado, é necessário ter em conta que anticorpo confere às AuNPs uma camada densa no sentido de este ter uma elevada massa molecular, comparativamente às AuNPs. Assim, há um grande impedimento estereoquímico para a aproximação das partículas entre si, conferindo, mais uma vez, uma maior estabilidade em solução.

Os bionanoconjugados AuNPs-MUA-anti-Hsp70(BSA) que serão a base do RDT, apresentam uma óptima estabilidade face a elevadas forças iónicas. Estes não apresentam qualquer variação na razão de agregação até forças iónicas de 500 mM, tornando-os candidatos muito fortes para o sucesso do RDT.

Este procedimento foi efectuado também para as AuNPs de 48nm de diâmetro, de forma a se verificar se as partículas tinham o mesmo comportamento em solução e se apresentavam

maior estabilidade, comparativamente com as AuNPs de 17nm. Os resultados obtidos estão representados na Figura 4. 14.

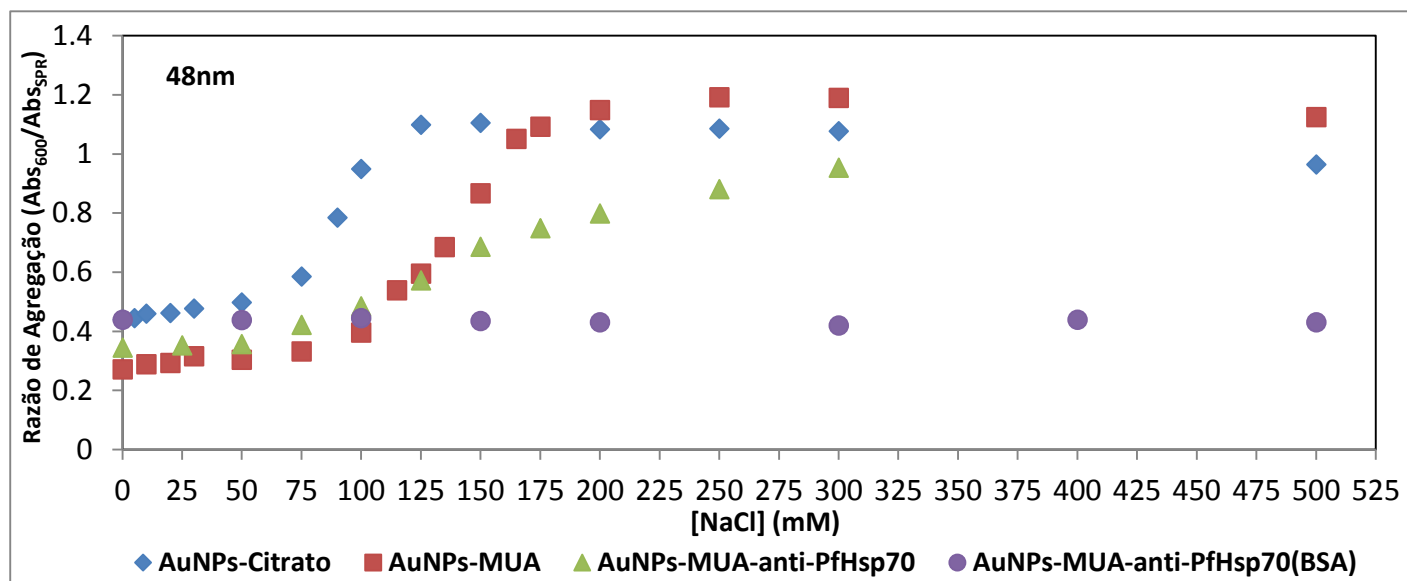


Figura 4. 14 - Razão de Agregação das AuNPs de 48nm com AuNPs-citrato, AuNPs-MUA e Bionanoconjugados em função do aumento da concentração de NaCl no meio.

Analisando os resultados obtidos, verificamos que as AuNPs de 48nm, de um modo geral, apresentam uma maior estabilidade em solução, comparando com as AuNPs de 17nm. Analisando os valores da Tabela 4. 3 e da Tabela 4. 4, concluímos que quanto maior é o diâmetro das partículas, maior é a força iônica necessária para atingir o ponto de agregação, logo, maior é a estabilidade apresentada. Nas AuNPs-citrato a diferença foi de 25mM e para as AuNPs-MUA foi de 15nM, comparativamente com as AuNPs de 17nm, no entanto, os BNCs sem bloqueio com BSA apresentaram o ponto de agregação em valores ligeiramente mais baixos de concentração de NaCl para BNCs com AuNPs de diâmetro 48nm. Apesar de ter agregado a valores sensivelmente mais baixos, a agregação não foi tão abrupta quanto a apresentada pelos BNCs 17nm sem bloqueio da BSA. Os BNCs com bloqueio da BSA, como era esperado, não apresentam agregação.

Tabela 4. 4 - Valores de concentração de NaCl nos quais foram atingidos os pontos de agregação para as AuNPs de 48nm com diferentes revestimentos.

AuNPs 48nm	AuNPs-Citrato	AuNPs-MUA	AuNPs-MUA-anti-PfHsp70	AuNPs-MUA-anti-PfHsp70(BSA)
Ponto de Agregação	85mM	140mM	180mM	Ausência de agregação até 500mM

Os bionanoconjugados (com BSA) formados com as AuNPs de 48nm são muito estáveis uma vez que não apresentarem agregação na gama de forças iônicas testada (0 - 500mM. Estes são também bons candidatos para uso no teste a elaborar.

4.6.2. VARIAÇÃO DO pH

Para as mesmas soluções, foi feito o estudo com a variação do pH do meio. O pH de uma solução de AuNPs-Citrato após síntese é cerca de 6,8. Em meio básico a solução não tem qualquer mudança no estado de agregação, pelo que foi testada uma gama de pH ácido, entre 2 e 7, como podemos observar na Figura 4. 15.

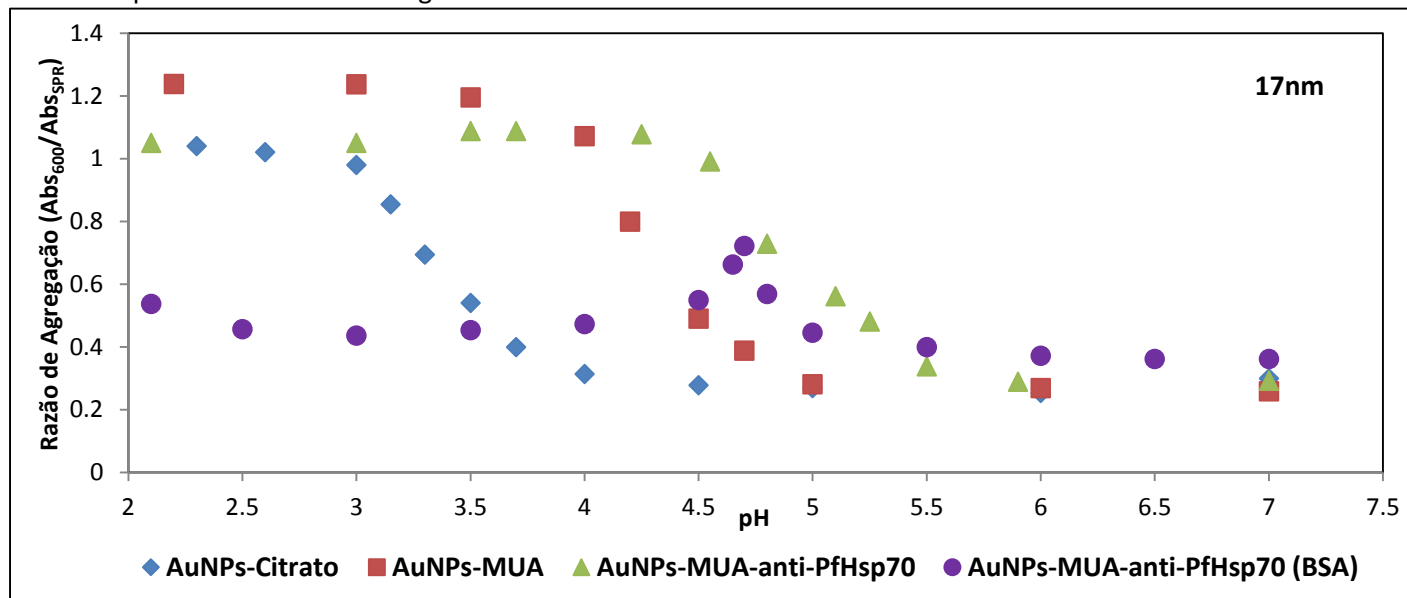


Figura 4. 15 - Razão de Agregação das AuNPs de 17nm AuNPs-citrato, AuNPs-MUA e Bionanoconjugados em função do pH no meio.

Analisando o comportamento das AuNPs com variação do pH do meio, verifica-se que a agregação das AuNPs ocorre nos valores de pH correspondentes aos de pI ou pK_a das moléculas usadas para o revestimento. Na Tabela 4. 5 apresentam-se os valores de pH ao qual foi atingido o ponto de agregação para as AuNPs com diferentes revestimentos.

Tabela 4. 5 - Valores de pH nos quais foram atingidos os pontos de agregação para as AuNPs de 17nm com diferentes revestimentos.

AuNPs 17nm	AuNPs-Citrato	AuNPs-MUA	AuNPs-MUA-anti-PfHsp70	AuNPs-MUA-anti-PfHsp70(BSA)
Ponto de Agregação	3	4,3	5	4,7*

Como podemos observar, para as AuNPs-Citrato, o ponto de agregação situa-se cerca do valor de pH 3, que corresponde ao pK_a da molécula de citrato de sódio⁷⁸. Neste ponto, há anulação das cargas superficiais das AuNPs, permitindo que estas se juntem. Para o caso do revestimento com MUA, o comportamento é semelhante uma vez que agregam cerca do pH 4,3, que mais uma vez se encontra próximo do valor de pK_a da molécula ácida⁷⁹. Os bionanoconjugados sem bloqueio da BSA, na qual na sua superfície apenas estavam dispostos imobilizados o anticorpo anti-PfHsp70, apresentou agregação a pH cerca de 5. Quando é atingido este valor, provavelmente há uma anulação das cargas dos resíduos carregados constituintes do anticorpo, que permite que haja uma aproximação entre partículas, agregando-as. Como se sabe, os anticorpos são moléculas muito resistentes (a sua purificação é feita com uma solução com pH 2,7), pelo que não desnaturam com valores de pH baixos. No caso dos bionanoconjugados com bloqueio, o processo de agregação foi muito peculiar na medida que apenas agregou no valor de pH 4,7, enquanto nos

*Apenas agrega a este pH. Abaixo e acima deste valor não há agregação

outros valores se apresentaram em estado colóide. Este processo foi confirmado tanto através das razões de agregação obtidas bem assim como pela cor da solução, que mudava de vermelho para azul arroxeado e novamente para vermelho. Para estes conjugados não se previa qualquer agregação uma vez que já demonstraram elevada estabilidade em solução quando variada a força iónica. O valor de pH de 4,7 corresponde ao valor do ponto isoeléctrico (pI) da proteína BSA⁸⁰. Quando os valores de pI e pH se igualam, há a anulação das cargas presentes nos resíduos da proteína acompanhado da sua desnaturação, o que provavelmente, permite que as AuNPs se juntem. Abaixo do pI, a BSA, apesar de desnaturada, está carregada, o que permite que as partículas se voltem a repelir. Além das cargas, pode correr um impedimento estereoquímico, por ser uma molécula grande (583 aminoácidos, 66kDa⁸⁰), afastando as AuNPs umas das outras, passando novamente a uma solução colóide.

Foram também estudadas, com o mesmo procedimento efectuado para as AuNPs de 17nm, as AuNPs de 48nm e os resultados encontram-se na Figura 4. 16.

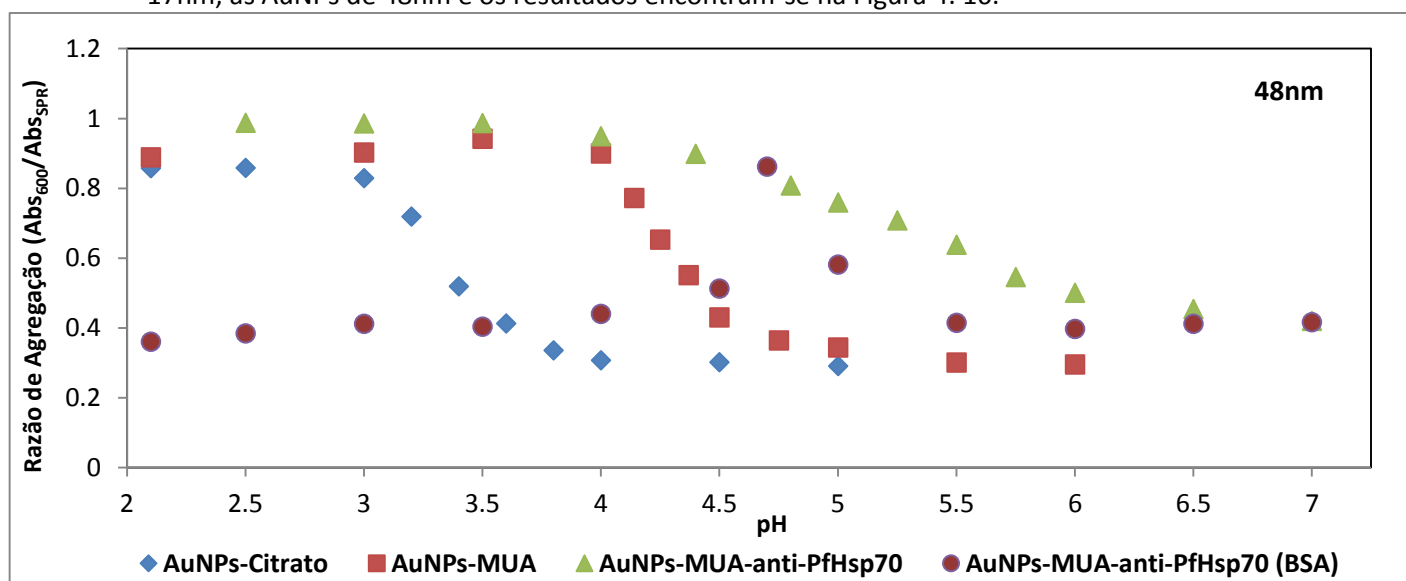


Figura 4. 16 - Razão de Agregação observada para as AuNPs de 48nm AuNPs-citrato, AuNPs-MUA e Bionanoconjugados em função do pH no meio.

O comportamento das AuNPs de 48nm foi muito semelhante ao apresentado pelas AuNPs de 17nm uma vez que apresentou agregação nos mesmos valores de pH da solução, para os diferentes revestimentos. As AuNPs-citrato, como podemos observar, agregaram a um pH cerca de 3, as com revestimento de MUA a cerca de 4,3, e as que apenas têm anticorpo a cerca de 5,25, como apresentado na Tabela 4. 6.

Tabela 4. 6 - Valores de pH nos quais foram atingidos os pontos de agregação para as AuNPs de 48nm com diferentes revestimentos.

AuNPs 17nm	AuNPs-Citrato	AuNPs-MUA	AuNPs-MUA-anti-PfHsp70	AuNPs-MUA-anti-PfHsp70(BSA)
Ponto de Agregação	3	4,3	5,25	4,7*

O valor de pH de agregação apresentado para ambos os BNCs (17 e 48nm) quando não estão bloqueados com a proteína BSA, é cerca de 5 e está relacionado com a presença do anticorpo na superfície. O facto de ambos os BNCs sem BSA agregarem neste valor, sugere que possa estar relacionado com o pI do anticorpo anti-PfHsp70. Quando este valor de pH atingido, as

*Apenas agrega a este pH. Abaixo e acima deste valor não há agregação

partículas agregam, não voltando a apresentar um estado coloide, sugerindo que não há desnaturação do anticorpo.

Para os BNCs de 48nm com bloqueio da BSA, tal como para os de 17nm, apresentaram um comportamento inesperado: mantiveram o seu estado coloide em toda a gama de pH estudada, com excepção da agregação apresentada apenas ao valor de pH de 4,7, voltando novamente ao seu estado coloide quando foi diminuído ainda mais o valor de pH.

Comparando os resultados obtidos é possível concluir que, com a variação do pH, a estabilidade das AuNPs e dos bionanoconjugados é dependente do seu revestimento, qualquer que seja o seu diâmetro. Ou seja, as AuNPs vão agregar quando o valor de pH do meio atingir o valor de pI da molécula de revestimento ou pK_a das proteínas imobilizadas na superfície, independentemente dos diâmetros das respectivas AuNPs e BNCs. Especificamente para o bloqueio com a proteína BSA, quando o pH iguala o pI, esta desnatura e à medida que se diminui o pH e a molécula linearizada promove o afastamento das AuNPs, contrariamente aos anticorpos, que não desnaturam.

Estudados os bionanoconjugados, foi possível prosseguir para o objectivo principal da dissertação: o desenvolvimento do teste de diagnóstico rápido.

4.7 ENSAIOS IMUNOCROMATOGRÁFICOS EM TIRAS DE NITROCELULOSE E PAPEL DE FILTRO USANDO PfHsp70

O teste foi elaborado em tiras de nitrocelulose de 0,2 μ m de diâmetro de poro e em papel de filtro. Para o desenvolvimento do RDT foi necessário otimizar um conjunto de parâmetros como seguidamente descrito. O teste é composto por uma zona de teste e por uma zona de controlo. Para as zonas constituintes do teste, a imobilização não foi feita em forma de linha, pois a amostra difunde circularmente ao longo do papel, formando uma mancha, pelo que o trabalho foi realizado com a detecção de manchas, denominadas por zonas.

O primeiro passo a otimizar foi a zona de controlo, onde se deposita uma gota de anti-anticorpo (anti-IgG). Além de estabelecer qual a concentração de anti-IgG a utilizar, foi também testado o tempo de incubação das gotas na tira de nitrocelulose após a sua deposição. Usar a menor quantidade de anti-IgG torna o teste mais económico e quanto menor for o tempo de incubação das gotas mais rápido o teste se torna. Para a escolha da concentração de anti-IgG a usar é necessário ter em conta que o teste não apresente uma cor dúbia, isto é, a cor tem que ser suficientemente intensa para permitir reconhecimento visual.

Para efectuar o teste, são adicionadas 2 gotas na tira de nitrocelulose, uma de anti-IgG e outra de proteína alvo, como está representado na Figura 3. 3 do capítulo III. Após secagem, todas as tiras são bloqueadas com uma solução de BSA 10mg/mL de forma a evitar interações inespecíficas no resto da tira. Após secagem, e uma vez que a nitrocelulose usada não permite a migração da amostra, estas são mergulhadas na solução de bionanoconjugados, como demonstrado na Figura 4. 17.

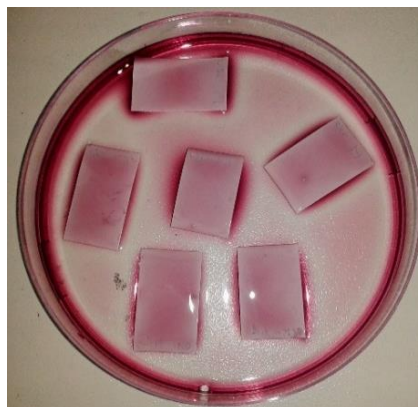


Figura 4. 17 – Incubação das tiras de nitrocelulose com a solução de bionanoconjugados.

Inicialmente foi estudada uma gama de concentrações de anti-IgG a usar na zona de controlo desde 2,5x até 100x diluído e foi depositada uma gota de 5µL de volume na membrana de nitrocelulose. Além da gama de diluições, foram também testados diferentes tempos de incubação da gota de anti-IgG na tira, como apresentado na Figura 4. 18. Todas as optimizações foram feitas com a proteína alvo *PfHsp70* e com os bionanoconjugados AuNPs-MUA-anti-*PfHsp70* com bloqueio da BSA usando AuNP de 17nm. Na zona de teste foi aplicada uma gota de proteína *PfHsp70* com 20µL de volume e 0,5mg/mL de concentração (de acordo com estudos elaborados anteriormente no laboratório). Até à optimização do tempo de mergulho das tiras de nitrocelulose na solução de BNCs, o tempo utilizado foi de 1h.

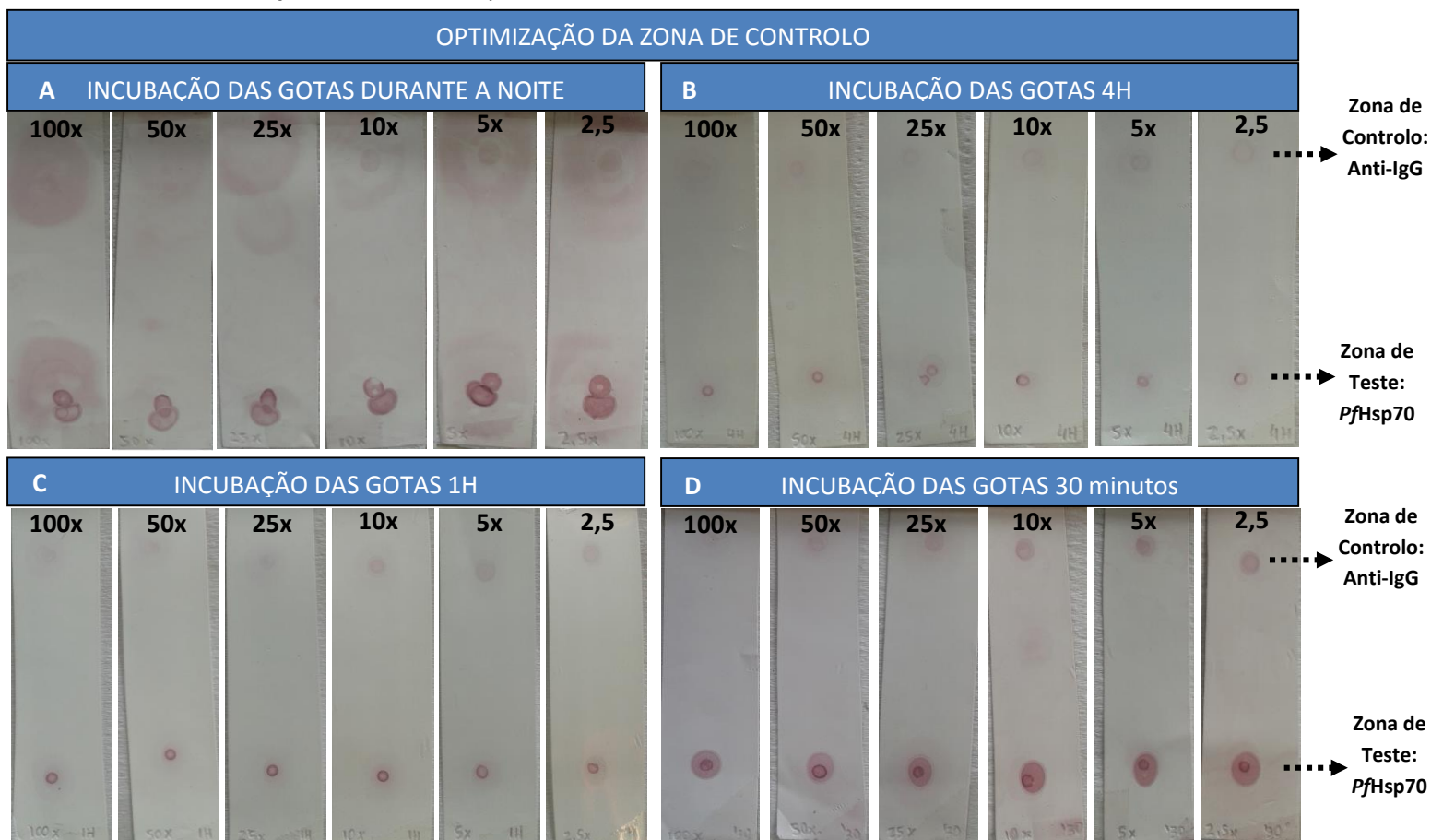


Figura 4. 18 – Optimização da concentração de anti-IgG na zona de controlo, com gota de 5 µL numa gama de diluições de 2,5x a 100x. A zona de controlo contém uma gota de 20µL de proteína *PfHsp70* a 0,5mg/mL. As gotas tiveram diferentes tempos de secagem: (A) Durante a noite; (B) 4h; (C) 1h; (D) 30 minutos. Incubação da tira de nitrocelulose com a solução 15nM de bionanoconjugados de 17nm durante 1h.

Através da obtenção de manchas vermelhas podemos garantir que está a haver reconhecimento da proteína alvo e/ou do anti-IgG pelo anticorpo imobilizado à superfície das AuNPs. A cor provém das partículas e só aparece quando todo o sistema “Proteína-Ab-AuNP” ou “anti-IgG-Ab-AuNP” está ligado. Se não houver ligação, a cor vermelha não é observada.

Analisando os testes efectuados, conclui-se que o reconhecimento do anti-IgG pelos bionanoconjugados é tanto melhor quanto menor o tempo de secagem das gotas. Isto sugere que para tempos de secagem elevados, poderá haver uma maior degradação ou mudança de conformação da amostra, que dificulta o reconhecimento. Observando os resultados com 30 minutos de secagem, a diluição de anti-IgG de 10 vezes apresenta uma mancha vermelha nítida comparativamente com as restantes condições.

De forma a tentar diminuir o tempo de secagem, fez-se um teste em que o tempo de incubação das gotas apenas foi o necessário para a sua secagem, mantendo-se inalteráveis as diluições de anti-IgG e a concentração de *PfHsp70*. Os resultados apresentam-se na Figura 4. 19.

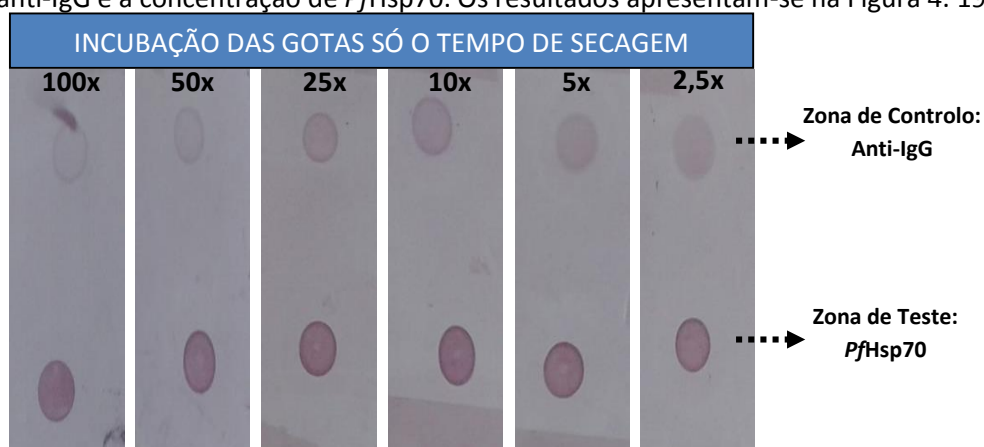


Figura 4. 19 – Optimização da concentração de anti-IgG na zona de controlo, com gota de 5µL numa gama de 2,5 a 100x diluído. O tempo de incubação das gotas foi apenas o necessário para a secagem. A zona de controlo contém uma gota de 5µL de *PfHsp70* a 0,5mg/mL. Incubação da tira de nitrocelulose com a solução 15nM de bionanoconjugados de 17nm durante 1h.

Com a diminuição do tempo de incubação das gotas, onde a secagem corresponde a cerca de 5 minutos, verificamos que o reconhecimento é bastante melhor, na medida em que com uma diluição de 25x de anti-IgG a mancha vermelha já é bastante perceptível. Assim, os melhores resultados obtidos correspondem a uma diluição do anti-IgG de 25x e a um tempo de secagem de cerca de 5 minutos, tempo necessário para as gotas nas tiras secarem ao ar.

Seguidamente procedeu-se à optimização da zona de teste, ou seja, da concentração e volume de gota de *PfHsp70* a utilizar. Realizaram-se testes numa gama de concentrações de antígeno entre 0,5mg/mL e 0,01mg/mL e apenas foi testada a linha de teste de forma a não gastar reagentes desnecessariamente. O teste apresenta-se na Figura 4. 20.

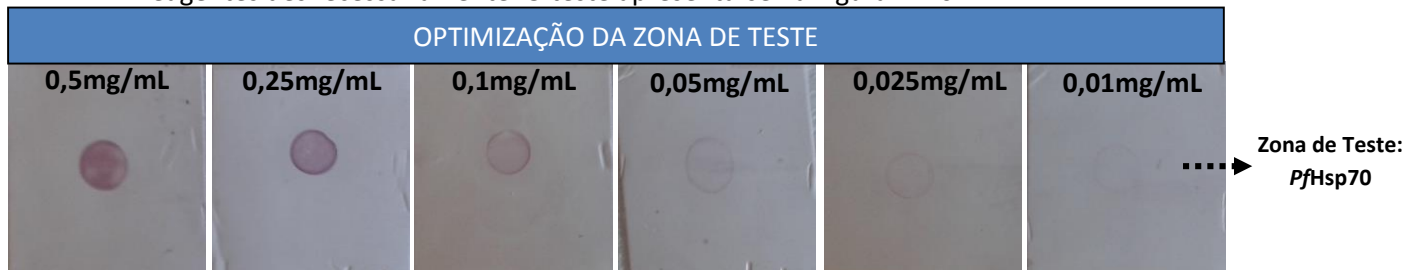


Figura 4. 20 – Optimização da concentração de *PfHsp70* na zona de teste. Testadas concentrações de antígeno entre 0,01 e 0,5mg/mL com gotas de 5µL. Incubação da tira de nitrocelulose com a solução 15nM de bionanoconjugados de 17nm durante 1h.

A concentração selecionada foi a de 0,25mg/mL uma vez que a essa concentração de antígeno já ocorre o reconhecimento por parte dos bionanoconjugados, conferindo uma boa cor. Abaixo dessa concentração há reconhecimento mas ainda não é suficiente para que AuNPs adotem uma boa intensidade de cor, que seja visível.

De seguida, foi optimizado o tempo de incubação com os bionanoconjugados. O tempo de incubação de 1h mostra um bom reconhecimento mas não torna o teste rápido. Assim, é de extrema importância reduzir este tempo de incubação com os BNCs. Foram testados vários tempos de incubação e comparadas as intensidades de cor, como demonstrado na Figura 4. 21.

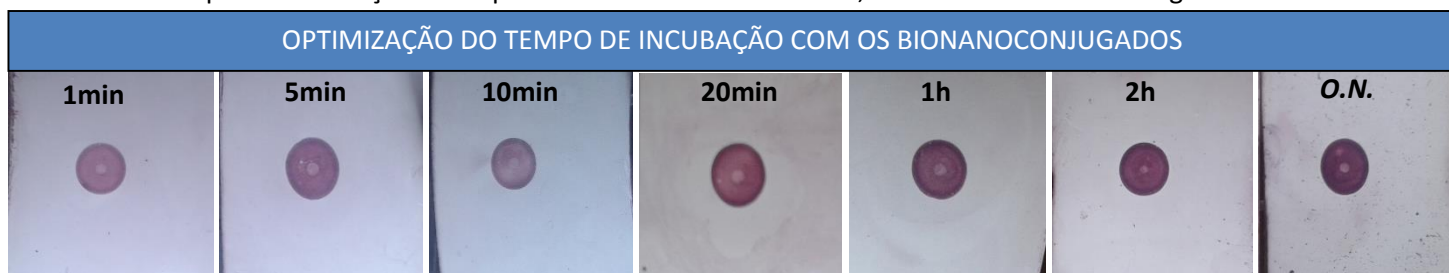


Figura 4. 21 - Optimização do tempo de incubação da tira de nitrocelulose com a solução de bionanoconjugados de 17nm e 15nM. Demonstrada a zona de teste com gota de 5µL de *PfHsp70* a 0,25mg/mL.

Após as gotas estarem secas e após bloqueio com BSA, verificou-se que não é necessário muito tempo para haver reconhecimento. Podemos verificar que logo ao fim de 1 minuto, há o aparecimento de uma mancha vermelha bastante nítida. Uma vez que se trata de um teste rápido, quanto menos tempo for necessário para obter uma resposta, mais valor terá o teste (desde que esta resposta seja específica e sensível). Quanto mais tempo se deixa a incubar, ligeiramente maior vai sendo a intensidade de cor apresentada. No entanto como se pretende desenvolver um teste de resposta rápida que indique a presença ou ausência de infecção com malária, 1 minuto de incubação na solução de bionanoconjugados mostrou ser o tempo suficiente.

Encontram-se assim estabelecidas as concentrações e volumes óptimos a usar nas zonas de teste, *PfHsp70*, e controlo, anti-IgG. Após colocar as gotas apenas é necessário o tempo de secagem, seguido de bloqueio da tira com BSA, que também só é necessário esperar o tempo de secagem. O teste está pronto a ser usado. De seguida, na Figura 4. 22, é mostrado um teste com resultado negativo e um teste com resultado positivo.

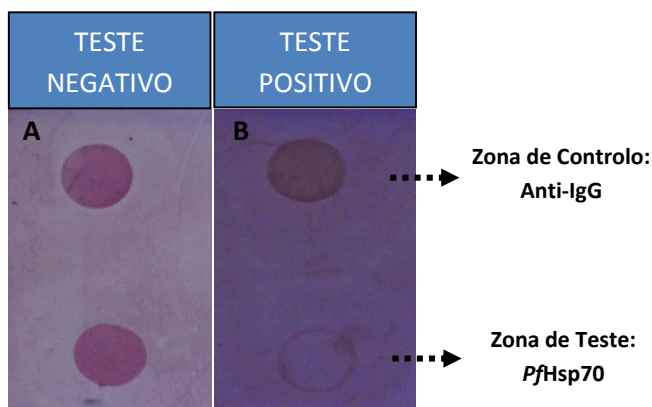


Figura 4. 22 – RDT em tiras de nitrocelulose ilustrando um teste negativo (A) e um teste positivo (B), utilizando bionanoconjugados (AuNPs-MUA-anti-*PfHsp70*) de 17nm a 15nM.

Como era esperado, no resultado negativo, uma vez que não existe antígeno na amostra, este não se vai ligar ao anticorpo presente à superfície das AuNPs. Posto isto, quando a solução

de BNCs entra em contacto com a tira de teste, estes ligam-se tanto na zona de controlo, devido à ligação anticorpo-anti-IgG, como na zona de teste, devido à ligação do anticorpo ao antígeno imobilizado na tira, apresentando duas manchas vermelhas. No caso do resultado positivo, é simulada uma “infecção” introduzindo o antígeno alvo, *PfHsp70*, na amostra, permitindo que este se ligue aos BNCs. Quando esta solução “infectada” entra em contacto com a tira, há a ligação na zona de controlo, devido à ligação anticorpo-anti-IgG (que ocorre sempre), mas não há a ligação na zona de teste uma vez que os locais de ligação do anticorpo no bionanoconjugado estão ocupados com o antígeno. Uma vez ligados, como se trata de um anticorpo monoclonal, este não irá ligar ao antígeno depositado na tira, apresentado apenas 1 mancha vermelha na zona de controlo. Esta mancha está ausente na zona de teste, tal como ilustra a Figura 4. 22-B.

O passo de bloqueio com a proteína BSA é muito importante para a obtenção de bons resultados. Este bloqueio impede que haja a ligação dos BNCs em locais não específicos, garantindo que este apenas se liga nos locais pretendidos: zonas de controlo e de teste. Na Figura 4. 23 estão ilustradas duas tiras de nitrocelulose onde a tira (A) foi sujeita ao passo de bloqueio com BSA, ao contrário da tira (B).

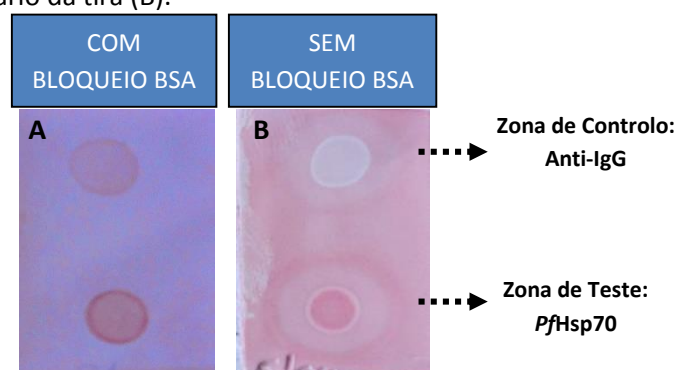


Figura 4. 23 – Representação da importância do uso da proteína BSA para bloquear a tira de nitrocelulose. A tira (A) foi bloqueada com BSA e a tira (B) não foi bloqueada.

Como se pode observar na Figura 4. 23, o passo de bloqueio é indispensável para se obter bons e claros reconhecimentos (A). Caso contrário (B), os bionanoconjugados ligam-se em toda a tira de nitrocelulose e não permitem que haja um bom reconhecimento, principalmente na zona de controlo.

Pretendeu-se também determinar a quantidade mínima de antígeno passível de ser detectada, ou seja, determinar o limite de detecção (LOD, *Limit of Detection*) do teste. Para tal, foram feitas várias soluções de bionanoconjugados com diferentes concentrações de *PfHsp70* de forma a simular uma amostra infectada. A incubação do antígeno com os bionanoconjugados ocorreu durante 2h, seguida de uma centrifugação para remover todo o antígeno não ligado. Efectuados o teste para cada amostra, os resultados da zona de teste estão apresentados na Figura 4. 24.

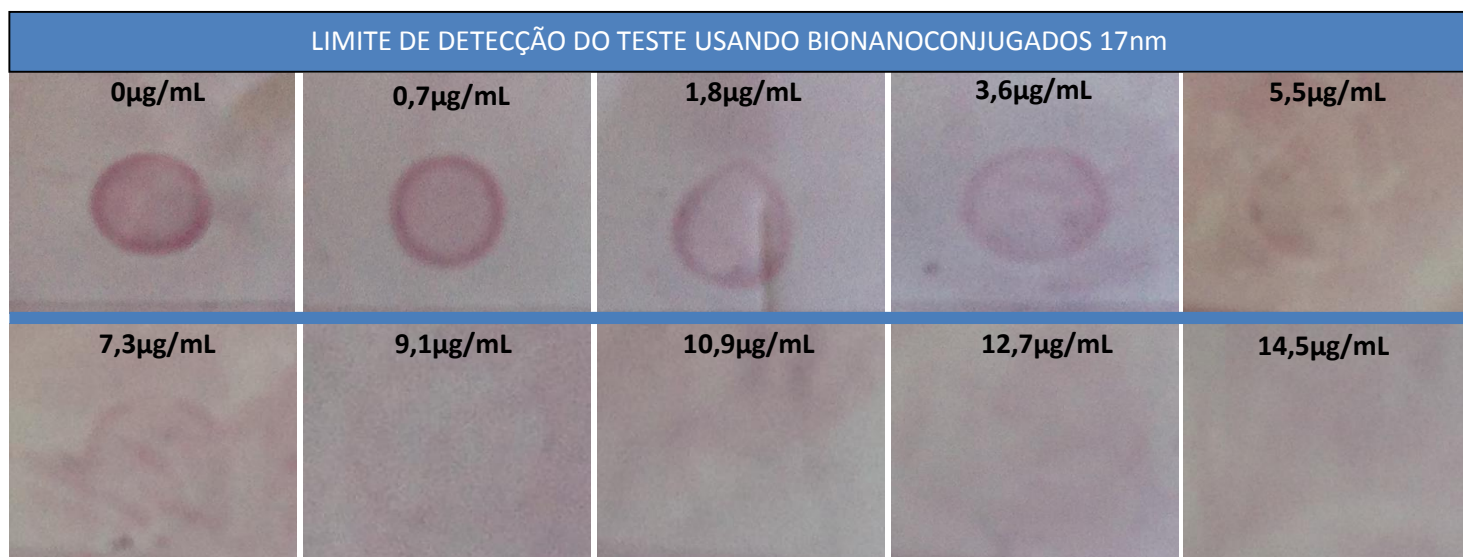


Figura 4. 24 – Determinação do limite de detecção do RDT na nitrocelulose utilizando os bionanoconjugados (AuNPs-MUA-anti-*PfHsp70*) de 17nm.

O limite de detecção refere-se à quantidade mínima de antígeno que pode ser detectada pelo teste. Em termos práticos, este corresponderá à quantidade na qual os BNCs deixam de reconhecer o antígeno imobilizado na nitrocelulose, uma vez que todos os seus locais de ligação no anticorpo estão já ocupados. Para o teste desenvolvido, o limite de detecção foi de 9,1µg por mL de amostra. Este valor convertido em número de parasitas, segundo *Guirgis et al*⁶, é de aproximadamente 1600 parasitas/µL. Este valor é considerado pela Organização Mundial de Saúde abaixo da densidade parasitária média encontrada em muitas populações com malária endémica⁸¹. Assim, o presente imunoensaio desenvolvido pode ser usado para diagnosticar a infecção por malária.

Com o intuito de melhorar o teste desenvolvido, diminuindo o limite de detecção, foram estudadas as AuNPs de 48nm, efectuando sempre o mesmo procedimento. Na Figura 4. 25 está demonstrado um teste negativo e um teste positivo utilizando os BNCs de 48nm, já estudados anteriormente.

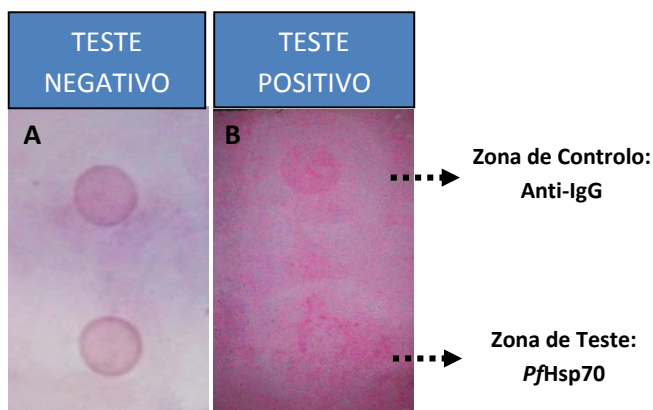


Figura 4. 25 - RDT em tiras de nitrocelulose ilustrando um teste negativo (A) e um teste positivo (B), utilizando bionanoconjugados (AuNPs-MUA-anti-*PfHsp70*) de 48nm a 1,32nM.

Foi possível obter um teste com resultado negativo e outro com resultado positivo, no entanto, neste último, a zona de controlo foi afectada com o aumento da concentração de antígeno *PfHsp70* em solução. A elevada quantidade de antígeno introduzida na solução de BNCs liga-se aos locais disponíveis de ligação no anticorpo. Devido ao excesso, o antígeno pode estar a formar um impedimento estereoquímico que não permite que haja a ligação do anticorpo

imobilizado à superfície das AuNPs com o anti-IgG imobilizado na membrana, resultando num fraco reconhecimento na zona de controlo.

Estas AuNPs seriam mais sensíveis à detecção da proteína alvo nas tiras de nitrocelulose caso de conseguisse diminuir o LOD, melhorando a capacidade do teste. Seguindo o procedimento efectuado para os BNCs de 17nm, foi estudado o limite de detecção do teste na presença de BNCs obtidos com AuNPs de 48nm de diâmetro. Os resultados obtidos para as zonas de teste encontram-se na Figura 4. 26.

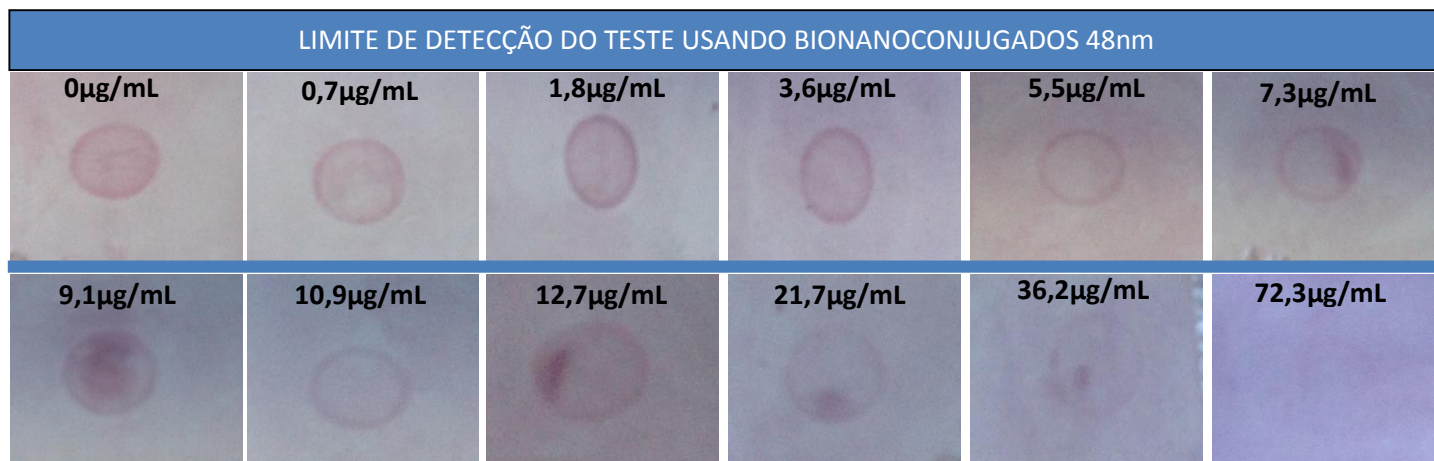


Figura 4. 26 – Determinação do limite de detecção do RDT na nitrocelulose utilizando os bionanoconjugados (AuNPs-MUA-anti-*PfHsp70*) de 48nm.

Como podemos observar, o limite de detecção no qual os BNCs de 48nm deixaram de reconhecer o antígeno imobilizado na nitrocelulose, foi com 72,3µg/mL. A este valor corresponde um elevado nível de parasitémia, acima dos valores recomendados pela WHO e acima dos obtidos com os BNCs de 17nm.

Uma vez que a área superficial das AuNPs de 48nm é cerca de 8 vezes maior do que as de 17nm (Ver cálculos em anexo 3), teoricamente deveria ter sido usada uma razão de anticorpo cerca de 8 vezes maior, ou seja, uma razão molar de 200, em vez da 125 que foi utilizada. Analisando os cálculos efectuados, a quantidade de anticorpo usada na solução de BNCs com AuNPs de 48nm é 4,5 vezes inferior à utilizada nos BNCs com AuNPs de 17nm. Desta forma, tendo menos anticorpo, é natural que detecte menor quantidade de antígeno, explicando que o limite de detecção obtido tenha sido consideravelmente superior. Além disso, a concentração que os BNCs constituídos por AuNPs de 48nm (1,32nM) apresentam é cerca de 11 vezes menor que os constituídos por AuNPs de 17nm (15nM). Se apresentassem a mesma concentração final, os bionanoconjugados poderiam-se tornar mais sensíveis e o LOD poderia ser significativamente menor.

Apesar de o uso dos BNCs de 48nm trazer inovações ao RDT, neste ensaio estes apresentaram um LOD superior, logo, tornam o teste menos sensível, o que não é o objectivo principal. Desta forma, os BNCs que apresentam resultados melhores nos testes nas tiras de nitrocelulose são os constituídos por AuNPs de 17nm.

Além da membrana de nitrocelulose de 0,2µm de diâmetro de poro, foi testada uma membrana de nitrocelulose de diâmetro de poros 0,45µm, de forma a promover a migração da amostra. Foram também testadas outras superfícies de teste como o papel de filtro e uma

membrana obtida comercialmente, a *FUSION5*⁸². Os resultados obtidos estão ilustrados na Figura 4. 27.

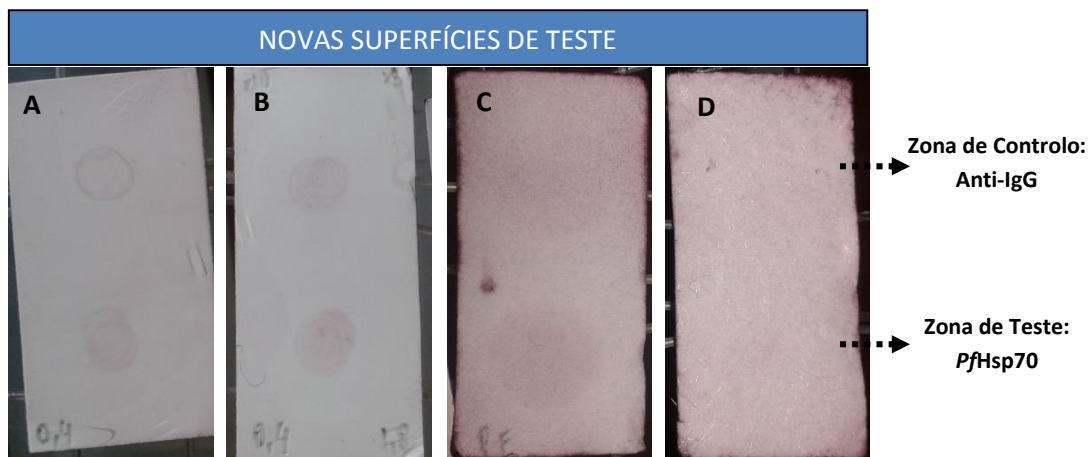


Figura 4. 27 – Teste em diferentes superfícies para elaboração do RDT. (A) e (B) membrana nitrocelulose 0,45 μ m; (C) papel de filtro; e (D) *FUSION5*. A membrana (A) (C) (D) têm na zona de controlo anti-IgG diluído 25x e na zona de teste PfHsp70 a 0,25mg/mL; a membrana (B) tem anti-IgG diluído 5x e PfHsp70 a 1,8mg/mL. Usados bionanoconjugados (AuNPs-MUA-anti-PfHsp70) de 17nm a 15nM.

Pretendeu-se utilizar uma membrana de nitrocelulose com maior diâmetro de poro para induzir a migração da amostra. Para todas as superfícies observou-se a migração, no entanto, a intensidade da cor apresentada é bastante menor que a apresentada pela membrana com 0,2 μ m de diâmetro de poro. A imagem (B) da Figura 4. 27 ilustra um teste igual ao (A) com a diferença das concentrações utilizadas, onde na (B) o anti-IgG foi utilizado com uma diluição de 5x e a PfHsp70 a 1,8mg/mL, de forma a verificar se a intensidade seria consideravelmente melhorada, sem sucesso. No papel de filtro houve boa migração e algum reconhecimento, confirmado pela presença das manchas vermelhas, no entanto, aquando da deposição das gotas de anti-IgG e PfHsp70 verificou-se um grande espalhamento da amostra. O facto de a amostra não ficar confinada faz com que haja menor intensidade de cor no reconhecimento. A membrana no *FUSION5* não apresentou qualquer melhoria na intensidade de cor para o teste.

O papel de filtro poderia dar bons resultados, caso fossem desenhados uns canais que conduzissem e confinassem a amostra de forma a mantê-la concentrada para que a intensidade de cor fosse significativa, permitindo detecção. Juntamente com o grupo de investigação liderado pela Professora Doutora Elvira Fortunato, do CENIMAT-I3N FCT-UNL, foi possível a obtenção de um papel de filtro com canais de cera desenhados (como está representado na Figura 3. 4 do capítulo III). Estes canais permitem a migração condicionada da amostra a analisar garantindo que a mesma passa nas linhas de controlo e de teste.

Tendo uma nova superfície de imobilização das amostras para elaboração do teste rápido, esta tinha que ser estudada para verificar se, de alguma forma, conseguíamos ter melhorias no teste desenvolvido. As optimizações conseguidas para a nitrocelulose foram extrapoladas para o papel de filtro, para que todo o procedimento fosse mantido. Usando o papel de filtro como superfície para o RDT, não só o torna consideravelmente mais económico como também consiste numa inovação para o estudo proposto. A superfície foi inicialmente testada com os BNCs de 17nm e os resultados estão ilustrados na Figura 4. 28.

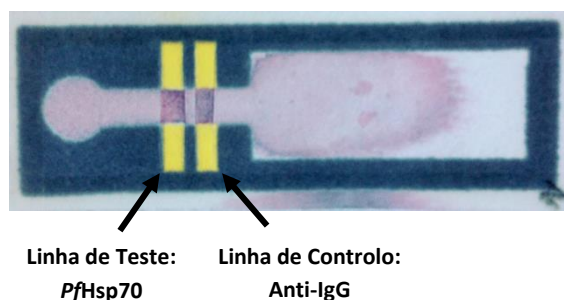


Figura 4. 28 – RDT em papel de filtro com canais de cera impressos. Resultado de um teste negativo, utilizando bionanoconjugados (AuNPs-MUA-anti-*Pfhsp70*) de 17nm a 15nM.

Outra vantagem apresentada pelo uso desta superfície é não necessitar do passo de bloqueio com a proteína BSA pelo que, após deposição das gotas das linhas de teste e controlo e respectiva secagem, o teste está pronto a ser usado. Na Figura 4. 28 está ilustrado um teste negativo, que apresenta, como esperado, 2 riscas vermelhas nas linhas de controlo e de teste com uma boa intensidade de cor. De seguida, foi determinado o LOD para esta nova superfície de imobilização. O procedimento foi efectuado de forma semelhante à usada nas tiras de nitrocelulose e os resultados obtidos referentes à zona de teste estão representados na Figura 4. 29.

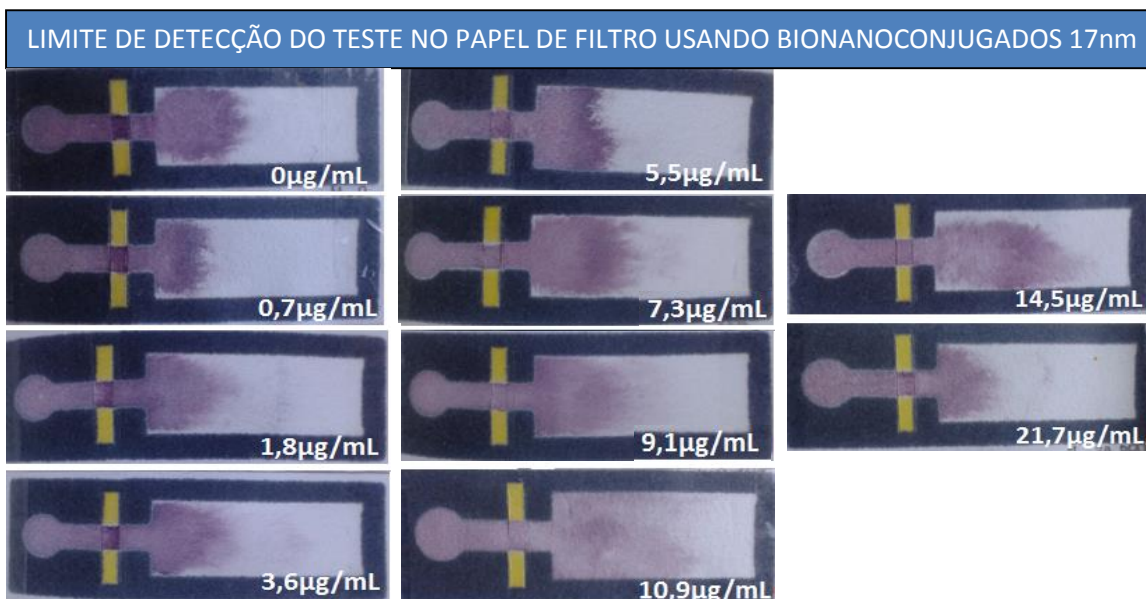


Figura 4. 29 – Determinação do limite de detecção em papel de filtro com canais de cera impressos usando os bionanoconjugados (AuNPs-MUA-anti-*Pfhsp70*) 17nm.

Como podemos observar, o limite de detecção registado no papel de filtro foi o mesmo que foi o observado, 9,1µg/mL, para as mesmas soluções de BNCs de 17nm infectados, na membrana de nitrocelulose. No entanto, os estudos usando o papel de filtro necessitam de aprofundamento uma vez que se mostram resultados promissores, com a grande vantagem de haver migração da amostra ao longo do teste.

4.8. ENSAIOS IMUNOCROMATOGRÁFICOS EM TIRAS DE NITROCELULOSE USANDO *Pf*HRPII

Uma vez otimizado o teste de diagnóstico rápido na nitrocelulose de baixa porosidade e já com bons resultados usando a proteína *Pf*Hsp70, deu-se início aos testes usando o outro antígeno-alvo, a *Pf*HRPII. Este antígeno é característico da presença do parasita no sangue, pelo que se torna um dos principais alvos de detecção para RDTs.

Para o estudo com a *Pf*HRPII, foi efectuado um teste na nitrocelulose usando as condições anteriormente optimizadas para o antígeno *Pf*Hsp70. O resultado obtido é ilustrado na Figura 4. 30.

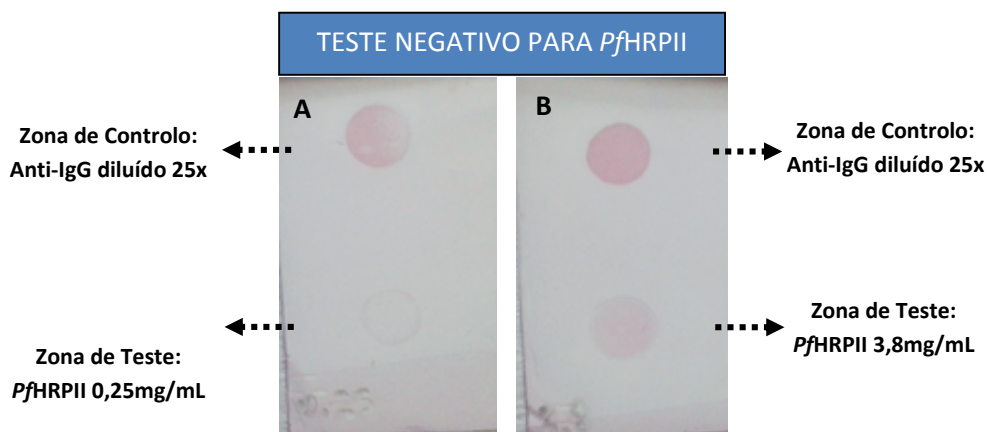


Figura 4. 30 - RDT em tiras de nitrocelulose ilustrando um teste negativo utilizando bionanoconjugados (AuNPs-MUA-anti-*Pf*HRPII) de 17nm a 15nM. Na zona de teste foi usada uma gota de 5µL da proteína *Pf*HRPII a 0,25mg/mL (A) e a 3,8mg/mL (B).

Extrapolando as optimizações efectuadas anteriormente, verificamos que há um fraco reconhecimento da *Pf*HRPII da zona de teste, como podemos observar na imagem A da Figura 4. 30. Este fraco reconhecimento pode ser devido a uma baixa concentração da proteína pura, e por esta razão foi aumentada a concentração da *Pf*HRPII na zona de teste para 3,8mg/mL (Figura 4. 30-B). Apesar do aumento da concentração, e consequente aumento da intensidade de cor, esta não foi suficientemente intensa para uma detecção satisfatória. O reconhecimento é visível mas não é tão intenso quanto o esperado e o pretendido. Uma causa possível para o fraco reconhecimento poderia ser proveniente da degradação da proteína, no entanto, verificou-se através de um gel SDS-PAGE que esta se encontra em boas condições. O problema poderá então estar relacionado com a especificidade apresentada pelo anticorpo anti-*Pf*HRPII ao antígeno alvo, uma vez que a ligação do anticorpo ao anti-IgG é visível na zona de controlo. No futuro será necessário dar continuidade ao desenvolvimento do RDT com a proteína *Pf*HRPII.

4.9. ENSAIOS DE WESTERN BLOT USANDO *Pf*HRPII

Usando a técnica de Western Blot pretende-se confirmar a ligação específica entre a proteína alvo *Pf*HRPII e o anticorpo anti-*Pf*HRPII, obtido comercialmente. A proteína *Pf*HRPII foi produzida em culturas de eritrócitos infectados por *P.falciparum*, como descrito no ponto 3.9 do capítulo III. É com os sobrenadantes da cultura que contém 0,7 e 1,7% de parasitemia que se realizam as experiências.

A revelação do Western Blot foi efectuado segundo dois procedimentos diferentes. O primeiro, mais tradicional, utiliza a quimioluminescência para quantificar indirectamente o sinal

produzido. Após a transferência do gel para a nitrocelulose, a incubação da membrana com o anticorpo específico permite que haja ligação com a proteína alvo. Uma vez ligado, o anti-*PfHRPII* é ainda reconhecido por um anticorpo secundário que por sua vez está ligado a uma enzima que produz um sinal quimioluminescente. O resultado obtido apresenta-se na Figura 4. 31.



Figura 4. 31 – Detecção da presença da proteína *PfHRPII* em cultura de eritrócitos infectados e não infectados. Revelação por quimioluminescência dos resultados de Western Blot onde foi usado anti-*PfHRPII*. MM – Marcador de Pesos Moleculares; 1 – Proteína *PfHRPII* 2mg/mL; 2 – Cultura infectada com 1,7% parasitemia concentrada; 3 – Cultura infectada com 1,7% parasitemia diluída 5x; 4 – Cultura infectada com 0,7% parasitemia concentrada; 5 – Cultura infectada com 0,7% parasitemia diluída 5x; 6 – Cultura não infectada; 7 – Proteína *PfHRPII* 0,78mg/mL.

O sinal de quimioluminescência é tanto maior quanto maior for o reconhecimento por parte dos anticorpos. Nos poços 1 e 7 foram introduzidas soluções diferentes da proteína *PfHRPII* para se confirmar a especificidade do anticorpo. No poço 1, a amostra estava demasiado concentrada, pelo que não foi possível a separação das bandas, no entanto, houve reconhecimento, não específico, traduzido em sinal quimioluminescente intenso. No poço 7, é possível observar uma banda, apesar de pouco nítida, a cerca de 50kDa, que corresponde à proteína *PfHRPII*. Os poços 2 a 5 correspondem a amostras infectadas e estes apresentam uma banda nítida a cerca dos 37kDa. Esta banda poderá corresponder à proteína *PfHRPIII* que, de acordo com Lee *et al*⁸³, é uma proteína muito semelhante à *PfHRPII* e que também pode ser produzida por *Plasmodium falciparum*⁴². A semelhança entre os vários aminoácidos presentes na sequência, confirmada por Shonhai *et al*³², sugere que o epítipo de ambas possa ser bastante idêntico, permitindo que o anticorpo se ligue, tornando-o pouco específico. Como era de esperar, na cultura não infectada não foi produzida qualquer proteína que seja reconhecida pelo anti-*PfHRPII*, não apresentando bandas (poço 6). Em suma, sabendo que as culturas infectadas produzem a proteína de interesse bem como esta se encontra no seu estado puro (poços 1 e 7), e uma vez que o anticorpo anti-*PfHRPII* não as reconhece, conclui-se que a sua sensibilidade está comprometida. Uma possível forma de combater esta lacuna poderia ser através do aumento da razão de anticorpo no BNC, para que estes consigam reconhecer as baixas concentrações de *PfHRPII* presente nas culturas infectadas.

Outro procedimento para a revelação dos resultados é através do uso dos bionanoconjugados, agora constituídos por AuNPs-MUA-anti-*PfHRPII* com AuNPs de 17nm. A

revelação usando este método está demonstrada na Figura 3. 5, do Capítulo III, e é bastante rápida e específica na medida que na superfície dos BNCs se encontra o anticorpo específico para a proteína alvo, *PfHRPII*, presente nas amostras. O resultado obtido é ilustrado na Figura 4. 32.

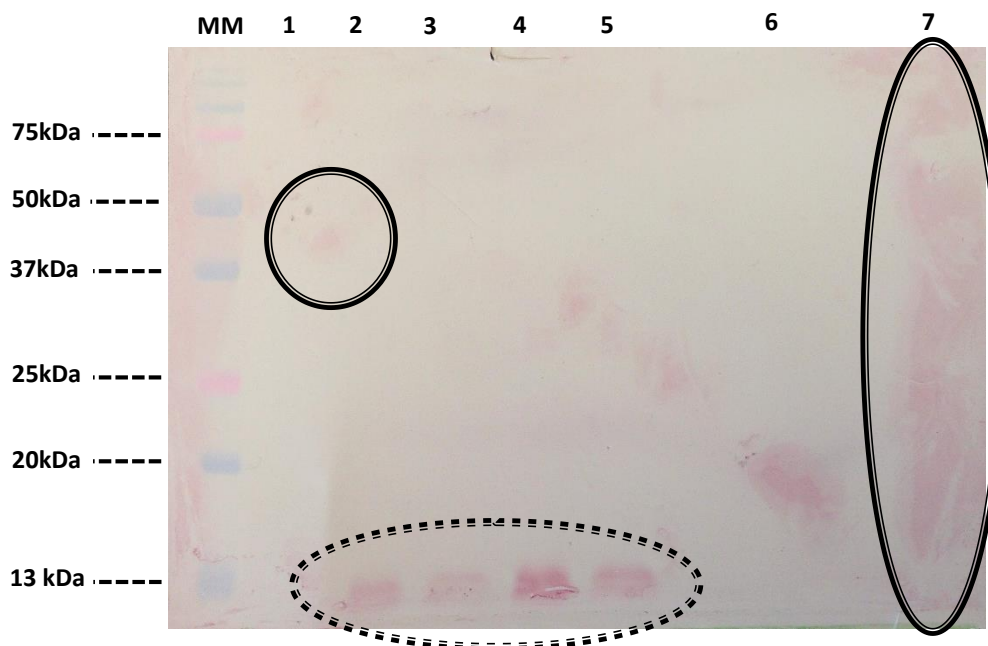


Figura 4. 32 - Detecção da presença da proteína *PfHRPII* em cultura de eritrócitos infectados e não infectados. Revelação dos resultados de Western Blot através do uso dos bionanoconjugados (AuNPs-MUA-anti-*PfHRPII*). MM – Marcador de Pesos Moleculares; 1 – Proteína *PfHRPII* 2mg/mL; 2 – Cultura infectada com 1,7% parasitemia concentrada; 3 – Cultura infectada com 1,7% parasitemia diluída 5x; 4 – Cultura infectada com 0,7% parasitemia concentrada; 5 – Cultura infectada com 0,7% parasitemia diluída 5x; 6 – Cultura não infectada; 7 – Proteína *PfHRPII* 0,78mg/mL.

O que é pretendido com este procedimento é que os bionanoconjugados reconheçam especificamente a proteína *PfHRPII* presente na membrana, tanto proveniente das culturas infectadas como das amostras de proteína introduzidas nos poços 1 e 7. Apesar de o resultado obtido não ser muito nítido, podemos observar uma mancha vermelha a cerca de 50kDa presente no poço 1, correspondente ao reconhecimento da proteína de interesse. No poço 7 podemos observar uma mancha vermelha contínua, onde se deduz que existe proteína *PfHRPII* ao longo do poço, que pode ser devido a algum arrastamento ocorrido durante o passo de electroforese. Nos poços 2 a 5, correspondentes às amostras infectadas, esperava-se uma mancha vermelha a cerca de 50kDa, que corresponderia à *PfHRPII* produzida durante a infecção causada pelo parasita, o que não se verificou. Observou-se sim uma mancha vermelha a cerca de 13kDa, que não foi possível identificar de que proteína se trata. No entanto, apenas existe este reconhecimento quando as culturas estão infectadas, indicando que não há produção desta proteína em culturas não infectadas, uma vez que há ausência desta banda no poço 6. Na cultura não infectada também não se espera a produção da proteína alvo, como é confirmado com a ausência da banda aos 50kDa.

Através de ambos os procedimentos podemos concluir que o problema na ligação anticorpo-antígeno está a surgir devido à falta de especificidade apresentada pelo anticorpo anti-*PfHRPII*, que foi obtido comercialmente. Quanto à sensibilidade dos métodos, nada se pode concluir, uma vez que não houve reconhecimento nítido da proteína alvo em qualquer um deles. Por norma no Western Blot, os métodos de detecção indirecta (quimioluminescência) são mais sensíveis que os de detecção directa (revelação com BNCs) na medida que existe a amplificação

do sinal por reacção enzimática. No entanto, o uso dos BNCs para a revelação poderia permitir uma elevada rapidez de revelação na medida que eram poupados vários passos com tempos de incubação, e as proteínas alvo podiam ser detectadas directamente na membrana através do uso dos anticorpos específicos presentes à superfície das AuNPs. Além disso, torna o método de revelação consideravelmente menos dispendiosos e mais prático, uma vez que não é necessário adquirir anticorpos secundários com enzimas acopladas, substrato de quimioluminescência, filmes reveladores nem é necessário ter uma câmara escura e aparelho revelador de filmes. Por outro lado, o uso das AuNPs tem como grande vantagem o seu baixo custo de síntese e terem uma grande superfície reaccional que permite a fácil conjugação com os anticorpos, e uma fácil visualização dos resultados através do aparecimento de bandas vermelhas sem ser necessário o recurso a equipamentos.

Página em Branco

CAPÍTULO V: CONCLUSÃO

5.1. SÍNTESE DO TRABALHO e DOS RESULTADOS

No presente trabalho, foi possível o desenvolvimento de um nanoimunoensaio, RDT, para a detecção de antígenos da malária, cumprindo-se o principal objectivo da presente dissertação.

Foram estudadas duas proteínas características da infecção com o parasita *Plasmodium falciparum*: a *Heat Shock Protein70* (PfHsp70) e *Histidine Rich ProteinII* (PfHRPII)

Uma vez que a proteína PfHsp70 se encontrava disponível para ser usada nos diversos estudos, a parte experimental do trabalho foi iniciada com a produção e purificação da proteína PfHRP. Estes procedimentos foram efectuados com êxito, embora sejam necessárias algumas optimizações. Estas devem incidir predominantemente no tempo e na temperatura após indução, e também na concentração de imidazole a utilizar durante a purificação da proteína. A pureza das proteínas foi estudada por electroforese em gel de SDS-PAGE e verificou-se que estavam puras o suficiente para o seu reconhecimento pelos anticorpos específicos nos imunoensaios. A sua quantificação foi efectuada pelo método de BCA, sendo que a proteína PfHsp70 apresentou uma concentração de 1,6mg/mL e a PfHRP de 0,78mg/mL.

A purificação do anticorpo anti-PfHsp70 com recurso a uma resina de proteína G foi eficiente, e determinou-se uma concentração de 1,5mg/mL. O anticorpo PfHRP foi obtido comercialmente com uma concentração de 6mg/mL, não necessitando de purificação adicional.

Para o estudo por espectroscopia de UV-Vis e, posteriormente, para o desenvolvimento do RDT proposto, foram estudadas AuNPs com dois diâmetros diferentes. As de 17nm foram sintetizadas no Bionanolab através do método desenvolvido por *Kimling*⁵³. Este método é bastante reprodutível na medida que gera partículas esféricas com tamanhos semelhantes nas diversas produções. As de 48nm, sintetizadas pelo laboratório do REQUIMTE da Faculdade de Ciências da Faculdade do Porto e analisadas por TEM, foram usadas com intuito de melhorar a sensibilidade da detecção e aumentar a estabilidade em solução.

Com base em estudos anteriores usando a espectroscopia de UV-Vis, concluiu-se que para as AuNPs de 17nm as razões molares necessárias para a formação do bionanoconjugado são de 1:5.000:25 (AuNPs-MUA-Ab). As razões de MUA e anticorpo, necessárias para revestir a superfície das AuNPs de 48nm, foram estudadas neste trabalho, sendo de 1:40.000:125. Nos BNCs de 17nm fica imobilizado 96% do anticorpo adicionado e 46% da BSA introduzida para bloqueio.

Com no estudo de estabilidade das AuNPs de 17 e 48nm com diferentes revestimentos (AuNPs-Citrato, AuNPs-MUA e Bionanoconjugados) concluiu-se que, com a variação da força iónica, as AuNPs-MUA mostraram ser mais estáveis que as AuNP-Citrato, na medida em que agregaram a forças iónicas maiores. Por sua vez, quando é imobilizado o anticorpo na superfície das AuNPs, estas tornam-se mais estáveis e, após o passo de bloqueio com a proteína BSA, a estabilidade em solução não é afectada com o aumento de sal em solução. Para o revestimento de citrato e MUA, as AuNPs de 48nm mostraram ser mais estáveis, agregando com forças iónicas superiores às apresentadas pelas AuNPs de 17nm. Tanto os BNCs (com bloqueio da BSA) baseados em AuNPs de 48nm como os BNC baseados em AuNP de 17nm, não apresentaram variação na sua estabilidade com o aumento da força iónica, até aos 500mM.

Variando o valor pH do meio entre 2 e 7 para os dois tamanhos de AuNPs, verificou-se que ocorre agregação quando o valor de pH do meio iguala o pI das moléculas que revestem as

AuNPs ou o pK_a das proteínas imobilizadas à superfície. Mais uma vez, os BNCs mostraram-se muito estáveis, apenas agregando no valor de pH de 4,7, que corresponde ao pI da proteína BSA, usada para bloquear os conjugados. A este valor de pH a BSA desnatura, e quando esta está linearizada promove o afastamento das AuNPs, voltando estas ao estado não agregado. Em suma, a estabilidade das AuNPs em função do pH é conferida pelo seu revestimento, independentemente do diâmetro. Os BNCs formados com as AuNPs de 17 e 48nm mostraram-se ambos consideravelmente estáveis na gama de forças iónicas entre 0mM a 500mM de cloreto de sódio e de pH entre 2 e 7, tornando-se óptimos candidatos para serem usados no RDT.

O RDT proposto tem como superfície de teste uma tira nitrocelulose, tendo sido optimizados diversos parâmetros. Após os estudos efectuados concluiu-se que para a zona de controlo é imobilizado o anti-IgG com uma gota de 5 μ L diluído 25x e, para a zona de teste, é imobilizada a proteína-alvo, *PfHsp70* ou *PfHRPII*, também com uma gota de 5 μ L com concentração de 0,25mg/mL. Após secagem das gotas, as tiras de nitrocelulose são mergulhadas numa solução de BSA 10mg/mL para serem bloqueadas. Quando a tira de nitrocelulose volta a secar, está preparada para ser utilizada como teste de detecção.

Utilizando uma solução de bionanoconjugados AuNPs-MUA-anti-*PfHsp70* com 15nM e AuNPs de 17nm, foi efectuado um teste negativo e um positivo. Simulando culturas infectadas, foi possível definir o limite de detecção do teste na nitrocelulose, sendo de 9,1 μ g/mL, que corresponde a 1600parasitas/ μ L de sangue. Este valor encontra-se dentro dos parâmetros considerados aptos pela OMS para a detecção da infecção. Procedendo de igual modo para as AuNPs de 48nm, o limite de detecção foi de cerca de 72 μ g/mL, o que corresponde a 12800parasitas/ μ L, valor este que já não é considerado apto pela OMS, não trazendo benefícios para o RDT desenvolvido. Para poder haver melhorias significativas, os BNCs constituídos por AuNPs de 48nm terão que ser utilizados com uma concentração 11 vezes superior.

Testando novas superfícies de imobilização, foi identificado o papel de filtro como um possível candidato para se desenvolver o RDT. Este, contrariamente à nitrocelulose, permitiu a migração da amostra, ao longo de canais de cera impressos. Contudo, quando testados os limites de detecção usando os bionanoconjugados de 17nm, não houve melhorias notáveis, comparando com os resultados obtidos na nitrocelulose. Serão necessárias novas optimizações para o teste usando superfície de papel de filtro para que seja possível obter melhores resultados.

No que respeita aos bionanoconjugados AuNPs-MUA-anti-*PfHRPII* foi possível executar um teste com um resultado negativo. No entanto, para se obter uma intensidade de cor considerável na zona de teste, foi necessário aumentar a concentração da gota de proteína *PfHRPII* para 3,8mg/mL, valor este bastante mais elevado do que o usado para a *PfHsp70*.

Para se poder analisar a especificidade do anticorpo anti-*PfHRPII* no reconhecimento do antígeno alvo (*PfHRPII*) foi efectuada a técnica de Western Blot usando culturas infectadas pelo parasita *Plasmodium falciparum*, culturas não infectadas e amostras da proteína pura, de forma a se confirmar a ligação do anticorpo. A revelação dos resultados foi efectuada por dois métodos: quimioluminescência, que é o método mais comum, e através do uso de uma solução de bionanoconjugados AuNPs-MUA-anti-*PfHRPII*.

Pelo sinal de quimioluminescência, apesar de pouco nítido, foi possível identificar a ligação do anticorpo à proteína *PfHRPII* pura. No entanto, para as culturas infectadas, houve apenas o reconhecimento de uma outra proteína, possivelmente *PfHRPIII*. Esta proteína é também produzida pelo parasita durante a infecção, e possui um epítipo semelhante³², podendo ser essa a razão para o reconhecimento pelo anti-*PfHRPII*. Usando a solução de BNCs para a

revelação dos resultados foi possível identificar a proteína pura, com a presença de uma banda vermelha. Nas culturas infectadas, não houve identificação de qualquer banda, pelo que os BNCs não se ligaram especificamente a qualquer antígeno alvo. Provou-se que a actividade do anticorpo se encontra intacta, uma vez que forma ligações com as proteínas. Todavia, a ligação não é tão específica quanto a necessária para o estudo pretendido, uma vez que ocorreu ligação com proteínas inespecíficas. Ainda assim, a utilização dos BNCs como método de revelação da técnica de Western Blot, mostrou ser bastante rápido, sensível e permite uma fácil visualização dos resultados obtidos.

Em suma, foi realizado por espectroscopia de UV-Vis um estudo aprofundado sobre o comportamento das AuNPs com diferentes tamanhos e revestimentos em solução, variando-se a força iónica e o pH do meio. Confirmada a elevada estabilidade de bionanoconjugados AuNPs-Anticorpo, foi possível desenvolver um teste de diagnóstico rápido, considerado apto pela OMS, usando nanopartículas de ouro para a detecção da proteína *PfHsp70* aquando da infecção de malária. O desenvolvimento de um teste para detecção da proteína *PfHRPII* necessita de um estudo aprofundado como explicado seguidamente em “Trabalho Futuro”.

Todo o projecto desenvolvido deu um grande passo para futuros estudos no desenvolvimento do RDT, com possibilidade de este ser usado em países subdesenvolvidos, em trabalho laboratorial e trabalho de campo.

5.2. TRABALHO FUTURO

A presente dissertação de mestrado pode ser futuramente desenvolvida em diversas vertentes, visando sempre obter cada vez melhores resultados.

Uma vez que a produção e purificação da proteína *PfHRPII* não foram totalmente eficientes, são aspectos que necessitam ser melhorados. Esta melhoria deverá englobar, no essencial, um conjunto de optimizações principalmente durante a purificação, nomeadamente nas concentrações a usar de imidazole usado nos tampões, bem como fazer um gradiente de concentrações no tampão de eluição.

No desenvolvimento do RDT, com vista a aumentar a sensibilidade do teste, deverá ser usada uma solução de BNCs constituídos por AuNPs de 48nm substancialmente mais concentrada ($\approx 15\text{nM}$), com uma razão molar de anticorpo superior.

Podem também ser introduzidas AuNPs com diferentes morfologias, introduzir diferentes agentes de acoplamento, como o EDC/NHS, e diferentes agentes de funcionalização das AuNPs, como o pentapéptido CALNN, de forma a promover a ligação do anticorpo à superfície das partículas e aumentar a sensibilidade.

Para os RDTs na nitrocelulose que usam a *PfHRPII*, é necessário optimizar a quantidade de anticorpo depositado à superfície das AuNPs, para que a detecção do antígeno específico seja mais sensível. Posteriormente, é necessário optimizar a quantidade de proteína depositada na zona de teste e, por último, determinar o limite de detecção.

No papel de filtro como superfície de suporte do RDT, será necessário optimizar o seu uso, de forma a promover uma boa detecção colorimétrica com limites de detecção iguais ou inferiores obtidos para a nitrocelulose.

Em estudos futuros o RDT poderá ser aplicado a culturas de sangue humano infectado com malária e, numa fase posterior, poderá ser utilizado laboratorialmente em amostras clínicas.

Página em Branco

CAPÍTULO VI: BIBLIOGRAFIA

1. Prudêncio, M., Rodriguez, A. & Mota, M. M. The silent path to thousands of merozoites: the *Plasmodium* liver stage. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**, 849–56 (2006).
2. Centers for Disease Control and Prevention. Consultado no endereço <<http://www.cdc.gov/>> em Setembro 2014
3. WHO | World Health Organization. Consultado no endereço <<http://www.who.int/en/>> em Setembro 2014
4. WHO | World Health Organization; World Malaria Report 2013. Consultado no endereço <http://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2013/en/> em Setembro 2014
5. Global Health Sciences. Consultado no endereço <<http://globalhealthsciences.ucsf.edu/>> em Setembro 2014
6. Guirgis, B. S. S. *et al.* Gold nanoparticle-based fluorescence immunoassay for malaria antigen detection. *Anal. Bioanal. Chem.* **402**, 1019–27 (2012).
7. Aly, A. S. I., Vaughan, A. M. & Kappe, S. H. I. Malaria parasite development in the mosquito and infection of the mammalian host. *Annu. Rev. Microbiol.* **63**, 195–221 (2009).
8. Pasvol, G. Protective hemoglobinopathies and *Plasmodium falciparum* transmission. *Nat. Genet.* **42**, 284–5 (2010).
9. Jones, M. K. & Good, M. F. Malaria parasites up close. *Nat. Med.* **12**, 170–1 (2006).
10. Bartoloni, A. & Zammarchi, L. Clinical aspects of uncomplicated and severe malaria. *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.* **4**, e2012026 (2012).
11. Nadjm, B. & Behrens, R. H. Malaria: an update for physicians. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **26**, 243–59 (2012).
12. Trampuz, A., Jereb, M., Muzlovic, I. & Prabhu, R. M. Clinical review: Severe malaria. *Crit. Care* **7**, 315–23 (2003).
13. Rosenthal, P. J. How do we best diagnose malaria in Africa? *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **86**, 192–3 (2012).
14. WHO 2012 | Malaria Rapid Diagnostic Test Performance | Summary results of WHO product testing of malaria RDTs: Round 1-4 (2008-2012). Consultado no endereço <http://www.who.int/malaria/publications/rdtmalaria_summary.pdf> em Setembro 2014
15. Wilson, M. L. Malaria rapid diagnostic tests. *Clin. Infect. Dis.* **54**, 1637–41 (2012).
16. Moody, A. Rapid Diagnostic Tests for Malaria Parasites. **15**, 66–78 (2002).
17. Murray, C. K. & Bennett, J. W. Rapid Diagnosis of Malaria. article review. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.* **2009**, (2009).

18. Bejon, P. *et al.* Thick blood film examination for *Plasmodium falciparum* malaria has reduced sensitivity and underestimates parasite density. *Malar. J.* **5**, 104 (2006).
19. Warhurst, D. C. & Williams, J. E. ACP Broadsheet no 148. July 1996. Laboratory diagnosis of malaria. *J. Clin. Pathol.* **49**, 533–8 (1996).
20. Bisoffi, Z., Gobbi, F., Buonfrate, D. & Van den Ende, J. Diagnosis of Malaria Infection with or without Disease. *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.* **4**, e2012036 (2012).
21. Cornelio, C. O. Malaria in South Sudan 3 : laboratory diagnosis. *Southern Sudan Medical Journal.* **4**, 13–16 (2011).
22. Gay, F., Traoré, B., Zanoni, J., Danis, M. & Fribourg-Blanc, A. Direct acridine orange fluorescence examination of blood slides compared to current techniques for malaria diagnosis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **90**, 516–518 (1996).
23. Delacollette, C. & Van der Stuyft, P. Direct acridine orange staining is not a “miracle” solution to the problem of malaria diagnosis in the field. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **88**, 187–8
24. Kawamoto, F. *et al.* Sequence variation in the 18S rRNA gene, a target for PCR-based malaria diagnosis, in *Plasmodium ovale* from southern Vietnam. *J. Clin. Microbiol.* **34**, 2287–9 (1996).
25. Redd, S. C. *et al.* Clinical algorithm for treatment of *Plasmodium falciparum* malaria in children. *Lancet* **347**, 223–227 (1996).
26. Tanaka, R. *et al.* A novel enhancement assay for immunochromatographic test strips using gold nanoparticles. *Anal. Bioanal. Chem.* **385**, 1414–20 (2006).
27. Singh, N., Valecha, N. & Sharma, V. P. Malaria diagnosis by field workers using an immunochromatographic test. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **91**, 396–7
28. Kakkilaya, B. S. Rapid Diagnosis of Malaria. *Lab. Med.* **34**, 602–608 (2003).
29. Rapid Test Malaria-Rapid Test Malaria Manufacturers, Suppliers and Exporters on Alibaba.com Pathological Analysis Equipments. Consultado no endereço <http://www.alibaba.com/trade/search?fsb=y&IndexArea=product_en&CatId=&SearchText=rapid+test+malaria&isPremium=y> em Setembro 2014
30. Banumathy, G., Singh, V. & Tatu, U. Host chaperones are recruited in membrane-bound complexes by *Plasmodium falciparum*. *J. Biol. Chem.* **277**, 3902–12 (2002).
31. Sharma, Y. D. Structure and possible function of heat-shock proteins in *falciparum* malaria. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Comp. Biochem.* **102**, 437–444 (1992).
32. Shonhai, A., Boshoff, A. & Blatch, G. L. The structural and functional diversity of Hsp70 proteins from *Plasmodium falciparum*. *Protein Sci.* **16**, 1803–18 (2007).
33. Misra, G. & Ramachandran, R. Hsp70-1 from *Plasmodium falciparum*: protein stability, domain analysis and chaperone activity. *Biophys. Chem.* **142**, 55–64 (2009).

34. Mayer, M. P. & Bukau, B. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**, 670–84 (2005).
35. Bell, S. L., Chiang, A. N. & Brodsky, J. L. Expression of a malarial Hsp70 improves defects in chaperone-dependent activities in ssa1 mutant yeast. *PLoS One* **6**, e20047 (2011).
36. Pavithra, S. R., Kumar, R. & Tatu, U. Systems analysis of chaperone networks in the malarial parasite *Plasmodium falciparum*. *PLoS Comput. Biol.* **3**, 1701–15 (2007).
37. Matambo, T. S., Odunuga, O. O., Boshoff, A. & Blatch, G. L. Overproduction, purification, and characterization of the *Plasmodium falciparum* heat shock protein 70. *Protein Expr. Purif.* **33**, 214–22 (2004).
38. Flaherty, K. M., Deluca-Flaherty, C., McKay, D. B. Three-dimensional structure of the ATPase fragment of a 70K heat-shock cognate protein. *Nature*. **346**. 623-628 (1990).
39. Saibil, H. Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 630–42 (2013).
40. Histidine-Rich Protein II (HRP2) |Malaria *in vitro* | malaria.farch.net. Consultado no endereço <<http://www.meduniwien.ac.at/user/harald.noedl/malaria/hrp2.html>> em Setembro 2014
41. Beadle, C. *et al.* Diagnosis of malaria by detection of *Plasmodium falciparum* HRP-2 antigen with a rapid dipstick antigen-capture assay. *Lancet* **343**, 564–568 (1994).
42. Baker, J. *et al.* Global sequence variation in the histidine-rich proteins 2 and 3 of *Plasmodium falciparum*: implications for the performance of malaria rapid diagnostic tests. 1–12 (2010).
43. Immune System Diagrams - Immune System. Consultado no endereço <<http://hashimotothyroiditis.weebly.com/immune-system-diagrams.html>> em Setembro 2014
44. Omidfar, K., Khorsand, F. & Darziani Azizi, M. New analytical applications of gold nanoparticles as label in antibody based sensors. *Biosens. Bioelectron.* **43**, 336–47 (2013).
45. Arruebo, M., Valladares, M. & González-Fernández, Á. Antibody-Conjugated Nanoparticles for Biomedical Applications. *J. Nanomater.* **2009**, 1–24 (2009).
46. Mody, V. V, Siwale, R., Singh, A. & Mody, H. R. Introduction to metallic nanoparticles. *J. Pharm. Bioallied Sci.* **2**, 282–9 (2010).
47. Baptista, P. V *et al.* Nanoparticles in molecular diagnostics. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **104**, 427–88 (2011).
48. Sperling, R. A. & Parak, W. J. Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles. *Philos. Trans. A. Math. Phys. Eng. Sci.* **368**, 1333–83 (2010).

49. Grzelczak, M., Pérez-Juste, J., Mulvaney, P. & Liz-Marzán, L. M. Shape control in gold nanoparticle synthesis. *Chem. Soc. Rev.* **37**, 1783–91 (2008).
50. Pingarrón, J. M., Yáñez-Sedeño, P. & González-Cortés, A. Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors. *Electrochim. Acta* **53**, 5848–5866 (2008).
51. Uechi, I. & Yamada, S. Photochemical and analytical applications of gold nanoparticles and nanorods utilizing surface plasmon resonance. *Anal. Bioanal. Chem.* **391**, 2411–21 (2008).
52. BioMEMS | Research | SIMSLab. Consultado no endereço <<http://simslab.uwaterloo.ca/research/biomems-sensors.php>> em Setembro 2014.
53. Kimling, J. *et al.* Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited. *J. Phys. Chem. B* **110**, 15700–7 (2006).
54. Turkevich, J., Stevenson, P. C. & Hillier, J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discuss. Faraday Soc.* **11**, 55 (1951).
55. Baptista, P. *et al.* Gold nanoparticles for the development of clinical diagnosis methods. *Anal. Bioanal. Chem.* **391**, 943–50 (2008).
56. Storhoff, J. J., Lucas, A. D., Garimella, V., Bao, Y. P. & Müller, U. R. Homogeneous detection of unamplified genomic DNA sequences based on colorimetric scatter of gold nanoparticle probes. *Nat. Biotechnol.* **22**, 883–7 (2004).
57. Ghosh, P., Han, G., De, M., Kim, C. K. & Rotello, V. M. Gold nanoparticles in delivery applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **60**, 1307–15 (2008).
58. Aggarwal, P., Hall, J. B., McLeland, C. B., Dobrovolskaia, M. A. & McNeil, S. E. Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **61**, 428–37 (2009).
59. Li, D., He, Q., Cui, Y., Duan, L. & Li, J. Immobilization of glucose oxidase onto gold nanoparticles with enhanced thermostability. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **355**, 488–93 (2007).
60. Cavadas, M., González-Fernández, A. & Franco, R. Pathogen-mimetic stealth nanocarriers for drug delivery: a future possibility. *Nanomedicine* **7**, 730–43 (2011).
61. Molina-Bolívar, J. A. & Galisteo-González, F. Latex Immunoagglutination Assays. *J. Macromol. Sci. Part C Polym. Rev.* **45**, 59–98 (2005).
62. Butler, J. M. *Forensic DNA Typing: Biology, Technology, and Genetics of STR Markers*. Academic Press. (2005)
63. Western Blotting Handbook. Consultado no endereço <<http://www.piercenet.com/objects/view.cfm?type=page&ID=03971E57-D4D0-4B97-971C-0632E8224535>> em Setembro 2014
64. Overview of Western Blotting. Consultado no endereço <<http://www.piercenet.com/method/overview-western-blotting>> em Setembro 2014

65. Virology toolbox: the western blot in Virology Blog. Consultado no endereço <<http://www.virology.ws/2010/07/07/virology-toolbox-the-western-blot/>> em Setembro 2014
66. Hanahan, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557–580 (1983).
67. The Recombinant Protein Handbook, Protein Amplification and Simple Purification, amersham pharmacia biotech. Edition AA, 18-1142-75, 8 (2000)
68. Ndonwi, M. *et al.* Inhibition of antithrombin by *Plasmodium falciparum* histidine-rich protein II. *Blood* **117**, 6347–54 (2011).
69. Tsuji, M., Mattei, D., Nussenzweig, R. S., Eichinger, D. & Zavala, F. Demonstration of heat-shock protein 70 in the sporozoite stage of malaria parasites. *Parasitol. Res.* **80**, 16–21 (1994).
70. Protein G Sepharose 4 Fast Flow | Affinity Chromatography | GE Healthcare (2007). Consultado no endereço <https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/RelatedContent/Files/1314774443672/litdoc18101291AC_20110831095008.pdf> em Setembro 2014
71. Protein G Antibody Affinity Chromatography | GE Healthcare Life Sciences. Consultado no endereço<http://www.gelifesciences.com/webapp/wcs/stores/servlet/catalog/pt/GELifeSciences-pt/products/AlternativeProductStructure_17384/> em Setembro 2014
72. Baptista, P., Doria, G., Henriques, D., Pereira, E. & Franco, R. Colorimetric detection of eukaryotic gene expression with DNA-derivatized gold nanoparticles. *J. Biotechnol.* **119**, 111–7 (2005).
73. Haiss, W., Thanh, N. T. K., Aveyard, J. & Fernig, D. G. Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-vis spectra. *Anal. Chem.* **79**, 4215–21 (2007).
74. Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit | BCA1 and B9643 | Technical Bulletin. Sigma-Aldrich
75. iBlot® Dry Blotting System. Invitrogen by life technologies™ (2011).
76. Ni-NTA Agarose | Qiagen. Consultado no endereço <<http://www.qiagen.com/products/catalog/sample-technologies/protein-sample-technologies/purification-kits-and-resins/ni-nta-agarose#productdetails>> em Setembro 2014
77. Cavadas, M. M. Gold nanoparticle to antibody conjugates for diagnosis applications : molecular interactions and immunoassay development. (2011). Tese Mestrado, Lisboa, FCT-UNL
78. Haynes, W. M. CRC Handbook of Chemistry and Physics, 95th Edition. *CRC Press* (2014).

79. Smalley, J. F., Chalfant, K., Feldberg, S. W., Nahir, T. M. & Bowden, E. F. An Indirect Laser-Induced Temperature Jump Determination of the Surface pKa of 11-Mercaptoundecanoic Acid Monolayers Self-Assembled on Gold. *J. Phys. Chem. B* **103**, 1676–1685 (1999).
80. Ge, S., Kojio, K., Takahara, A. & Kajiyama, T. Bovine serum albumin adsorption onto immobilized organotrichlorosilane surface: influence of the phase separation on protein adsorption patterns. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **9**, 131–50 (1998).
81. WHO | World Health Organization - Parasitological confirmation of malaria diagnosis. Report of a WHO technical consultation. Geneva (2010).
82. Jones, K. Chapter 7: Fusion5: A new platform for a lateral flow immunoassay Tests, Lateral Flow Immunoassay, *Human Press*, 115-129 (2009).
83. Lee, N. *et al.* Effect of sequence variation in Plasmodium falciparum histidine- rich protein 2 on binding of specific monoclonal antibodies: Implications for rapid diagnostic tests for malaria. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 2773–8 (2006).
84. SDS-PAGE (2001). Consultado no endereço <https://ww2.chemistry.gatech.edu/~lw26/bCourse_Information/4581/techniques/gel_elect/page_protein.html> em Setembro 2014.
85. Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K. *et al.* Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid, *Analytical Biochemistry*, **150**, 76–85 (1985).

ANEXOS

1. ELECTROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA – SDS-PAGE

A electroforese é um método que se baseia nas diferenças de mobilidade electroforética quando é aplicado um campo eléctrico. Desta forma, permite que haja separação das diferentes moléculas electricamente carregadas numa solução. De uma forma geral, a migração das moléculas depende de dois factores, o tamanho e a carga, o que faz com que haja diferentes velocidades de migração. O gel de acrilamida (PAGE, PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) é formado quimicamente através da polimerização dos monómeros de acrilamida na presença de uma quantidade variável de bisacrilamida. A concentração utilizada de acrilamida e bisacrilamida faz variar o tamanho dos poros do gel, e este são tanto mais pequenos quanto maior a concentração, ou percentagem do gel⁶². Este processo de polimerização é iniciado pela formação de radicais livres pelo persulfato de amónia e estabilizados pelo composto TEMED (N,N,N',N'-tetrametilenodiamina). A polimerização leva à formação de uma longa cadeia de monómeros de acrilamida com ligações cruzadas fornecidas pela presença do reagente conector bisacrilamida⁶².

O uso do detergente aniónico SDS permite que haja uma redução das moléculas hidrofóbicas e das pontes de dissulfureto, garantindo assim que as proteínas adoptam uma estrutura primária e linear, desnaturando-as. Além da estrutura linear que adquirem, ficam também carregadas negativamente a toda a volta. Quando as proteínas desnaturadas ficam sujeitas a uma carga eléctrica, e uma vez que estão negativas, têm tendência para migrar para o pólo positivo, o cátodo, sem haver separação por carga. Por forma a monitorar os resultados que estão contidos no gel, é utilizado um corante, neste caso o azul coomassie, que se vai ligar especificamente às proteínas. Desta forma, aparecem bandas que correspondem à presença da proteína. É importante o uso de um marcador de pesos moleculares para, depois da corrida, termos uma referência de comparação para podermos estimar o peso molecular da proteína alvo, bem como analisar a pureza da solução. Na Figura A 1 é ilustrado o aparato usado para efectuar a técnica de SDS-PAGE.

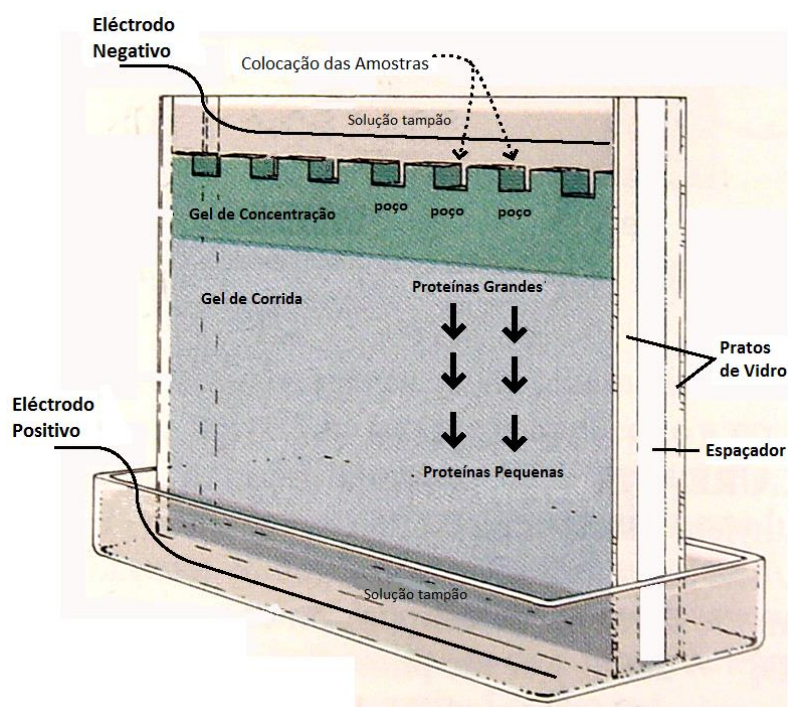


Figura A 1 – Representação do aparato usado para a técnica de SDS-PAGE. Adaptado de ⁸⁴

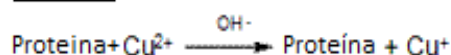
O gel é dividido em duas secções: o gel de concentração e o de corrida. O primeiro tem como objectivo colocar todas as proteínas ao mesmo nível para que, quando entrarem no gel de corrida, comecem todas a partir do mesmo ponto, para poderem ser comparadas.

2. QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA USANDO O MÉTODO DE BCA

Para quantificar cada proteína de interesse procedeu-se ao método de Smith⁸⁵, mais conhecido por BCA para determinar a concentração de proteínas totais. Apesar de existirem outros métodos de quantificação de proteínas, o método do BCA é bastante sensível e não apresenta interferências com as proteínas em uso. Além disso, é um método relativamente barato, rápido e encontra-se disponível no laboratório.

Este baseia-se na reacção entre o Cobre (II) com as proteínas presentes no meio, a 37°C, formando Cobre (I) e complexos de BCA que absorvem fortemente na região dos 562nm⁷⁴ de comprimento de onda, como mostrado na Figura A 2.

Passo 1:



Passo 2:

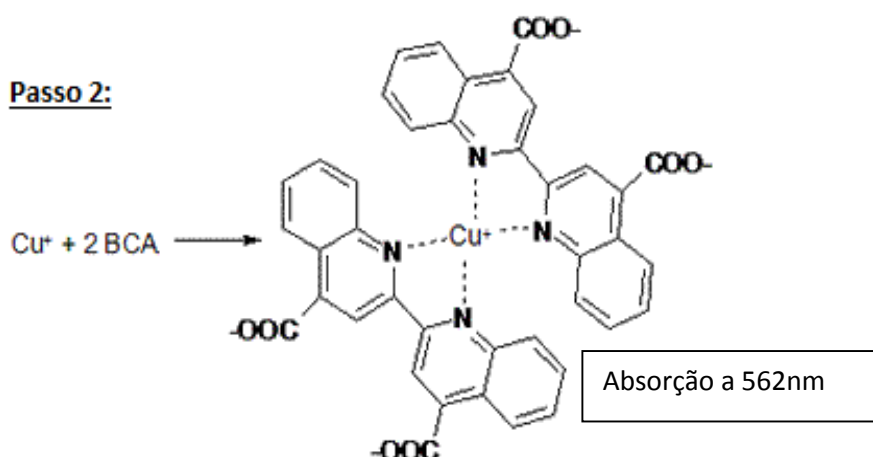


Figura A 2 – Reacção que ocorre no método BCA para determinação na concentração da proteína total em solução.

Após a incubação das amostras durante 30 minutos a 37°C, são efectuadas rectas de calibração com a proteína BSA para se poder determinar a concentração das proteínas de interesse, como já explicado no ponto 3.8.2 do Capítulo III - Materiais e Métodos. A proteína BSA *stock* tem concentração conhecida (1mg/mL) e são adicionados diferentes volumes em cada alíquota para a construção da recta. De seguida, na Figura A 3, apresenta-se a recta de calibração obtida para o cálculo da concentração da proteína PfHsp70

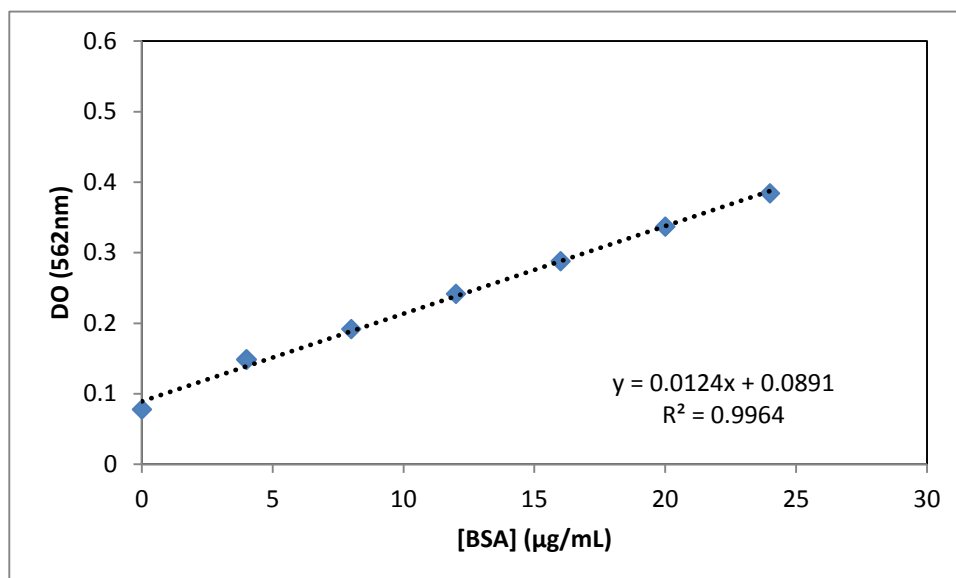


Figura A 3 - Recta de calibração pelo método de BCA para quantificação da proteína *PfHsp70* recombinante.

Através da equação da recta de calibração obtida, é possível obter os valores de concentração da amostra pretendida. Os valores de OD obtidas para as amostras de *PfHsp70* bem como a concentração calculada estão apresentados na Tabela 4. 1 do capítulo IV – Resultados e Discussão.

Efectuando o mesmo procedimento, efectuou-se de igual forma uma recta de calibração utilizando a proteína BSA 1mg/mL para proceder ao cálculo da concentração da proteína *PfHRPII*, que se apresenta de seguida na Figura A 4.

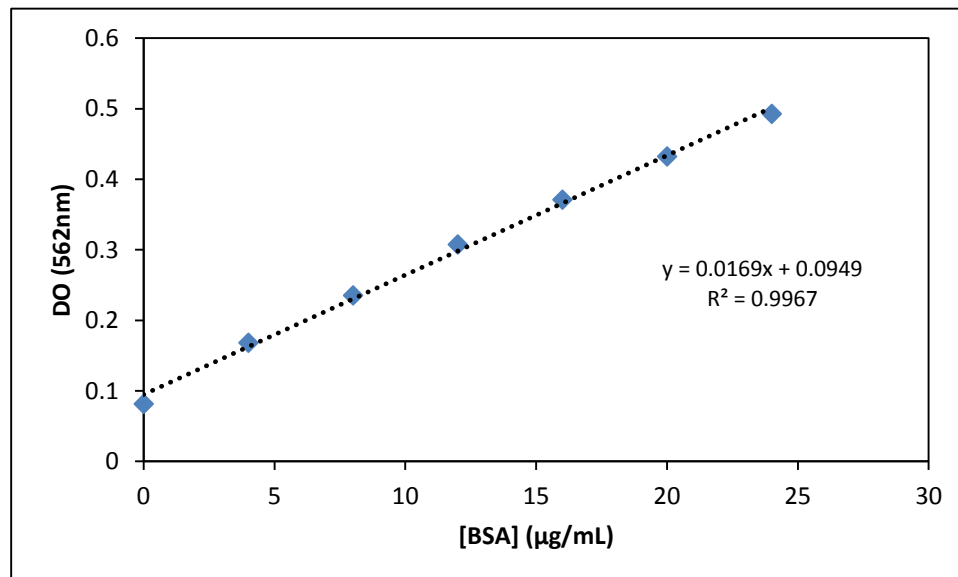


Figura A 4 - Recta de calibração pelo método de BCA para quantificação da proteína *PfHRPII* recombinante

Através da equação da recta obtida, foi calculada a concentração. Os valores de OD obtidos para a amostra de *PfHRPII* estão apresentados na Tabela 4. 2 do capítulo IV – Resultados e Discussão.

O estudo que permitiu inferir que quantidade de anticorpo e de proteína BSA eram necessários para formar um bionanoconjugado com AuNPs de 17nm foi pelo método do BCA. Para

isso, foi novamente traçada uma recta de calibração usando a proteína BSA 1mg/mL, como demonstrado na Figura A 5.

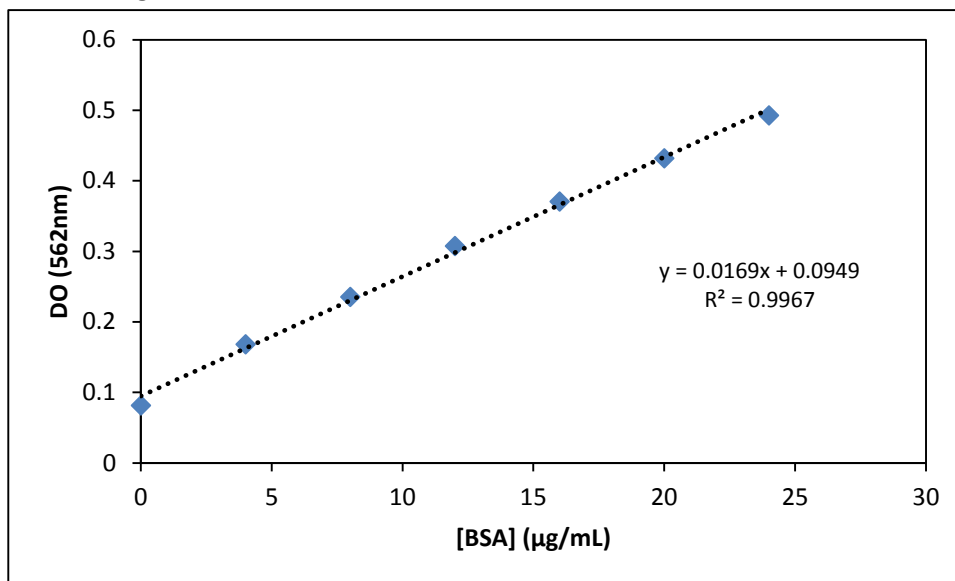


Figura A 5 - Recta de calibração pelo método de BCA para definição da quantidade de anticorpo e BSA que formam o Bionanoconjugado de 17nm.

Pela equação da recta de calibração, foi possível calcular a quantidade de proteína presente nas amostras, dependente da OD registada para cada amostra. De seguida, na Tabela A 1, apresentam-se os resultados da OD para cada passo de lavagem.

Tabela A 1 – Valores de concentração obtidos para as amostras dos sobrenadantes das 3 lavagens na formação dos bionanoconjugados.

	Volume (µL)	DO (562nm)	Concentração (mg/mL)
1ª Lavagem	20	0,0795	0,1
	20	0,0788	0,0
	40	0,0895	0,7
	40	0,0872	0,6
	80	0,0986	1,3
	80	0,1034	1,6
2ª Lavagem	50	3,3764	228,4
	50	3,8457	260,9
	100	4,1672	282,7
	100	3,8306	259,9
3ª Lavagem	50	0,4507	25,7
	50	0,4329	24,4
	100	0,6791	41,5
	100	0,6861	42,0

Tendo em conta as diluições efectuadas, foi possível calcular a concentração correcta de proteína que saiu em cada uma das lavagens.

3. CÁLCULOS AUXILIARES PARA A DETERMINAÇÃO DA QUANTIDADE DE MUA E ANTICORPO DEPOSITADOS À SUPERFÍCIE DAS AuNPs DE 17nm e 48nm

$$\text{Volume esfera} = \left(\frac{4}{3}\right) \pi r^3$$

$$\frac{\text{Volume AuNPs 48nm}}{\text{Volume AuNPs 17nm}} = \left(\frac{48}{17}\right)^3 = 22.5$$

$$\text{Área superficial da esfera} = 4\pi r^2$$

$$\frac{\text{Área AuNPs 48nm}}{\text{Área AuNPs 17nm}} = \frac{7238}{908} = 8$$

A volume das AuNPs de 48nm é 22,5 vezes maior do que a volume apresentado pelas AuNPs de 17nm, confirmado pelos cálculos, tornando-a significativamente maior. Em relação à área superficial, as AuNPs de diâmetro 48nm têm-na cerca de 8 vezes maior do a apresentada pelas AuNPs de 17nm, suportando a teoria de que quanto maiores forem as partículas, maior é a área superficial apresentada.

De forma a confirmar que usando AuNPs de diâmetros maiores (48nm) estaríamos a baixar o custo do teste, gastando menos MUA e Anticorpo para formar os Bionanoconjugados, foram feitos os cálculos, apresentados na Tabela A 2.

Tabela A 2 – Cálculos para determinação da quantidade de MUA e anticorpo necessária para depositar à superfície das AuNPs de 17nm e 48nm.

AuNPs 17nm				AuNPs 48nm			
[AuNPs]	2.50E-09	M		[AuNPs]	1.10E-10	M	
Volume Inicial	2.00E-02	L		Volume Inicial	2.00E-02	L	
[MUA]	1.00E-02	M		[MUA]	1.00E-02	M	
Volume MUA necessário	2.50E-05	25.00	μL	Volume MUA necessário	8.80E-06	8.8	μL
[anti-PfHsp70]	1.36E-05	M		[anti-PfHRPII]	1.36E-05	M	
Volume anticorpo necessário	9.19E-05	91.91	μL	Volume anticorpo necessário	2.02E-05	20.22	μL

$$\frac{\text{Volume de MUA AuNPs 17nm}}{\text{Volume de MUA AuNPs 48nm}} = \frac{25}{8.8} = 2,8 \rightarrow \text{Diferença da Razão de MUA}$$

$$\frac{\text{Volume de Anticorpo AuNPs 48nm}}{\text{Volume de Anticorpo AuNPs 17nm}} = \frac{91.91}{20.22} = 4.5 \rightarrow \text{Diferença da Razão de Anticorpo}$$

Através dos cálculos é possível confirmar que utilizando AuNPs com maior diâmetro, neste caso de 48nm, é possível gastar menos MUA e menos Anticorpo, tornando o RDT mais barato na medida que se gastam menos reagentes. No caso do MUA usa-se cerca de 3 vezes menos quantidade para funcionalizar a partícula e, no caso do anticorpo, a quantidade é 4,5 vezes menor.